

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉPONSE PHOTOSYNTHÉTIQUE ET BIOCHIMIQUE
DE PHYTOPLANCTON EXPOSÉ À UNE SOLUTION
COMMERCIALE DE GLYPHOSATE:
CONSÉQUENCES SUR L'ALIMENTATION
DU CLADOCÈRE *DAPHNIA MAGNA*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
À LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
THIBAUT CHESNEY

JUIN 2015

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

La réalisation d'un tel projet ne se fait pas sans le soutien de nombreuses personnes, qu'elles soient directement liées ou non à sa réalisation.

Mes premiers remerciements vont vers mon directeur de recherche, le Pr Philippe Juneau qui a mis à disposition les moyens matériels à la réalisation des différents volets que comportent ces travaux.

J'adresse également des remerciements tout particuliers au Dr Akash Sastri qui m'a beaucoup apporté lors de la réalisation de ce projet. Sa vision des sciences a été très inspirante et source de motivation à bien des reprises.

Je remercie également l'ensemble des collègues de laboratoire pour leur bonne humeur et leur aide souvent précieuse dans l'avancée des expériences. Merci donc (par tirage aléatoire) à Annie Chalifour, Marie-Claude Perron, Fran Bristow, Francis Racine (pour la musique, la biochimie et les longues discussions politiques), Élise Smedbol, Gabrielle Vernouillet, Charles P. Deblois, Kui Xu, Andréanne Girard-Kemp et Marcelo Gomes.

Les plusieurs années m'ont également permis de rencontrer des personnes très généreuses qui ont également une bonne part de mérite dans l'achèvement de cette maîtrise. Merci donc à Monique Boily, Denis Flipo, Catherine Jumarie, Beatrix Beisner ainsi que les Dr. Sarma et Nandini de l'Université Nationale Autonome du Mexique (Universidad Nacional Autónoma de Mexico) pour leur accueil au sein de leur laboratoire.

Enfin, merci à tous mes proches qui m'ont toujours suivi et soutenu dans des décisions et des moments parfois difficiles. Sentir ce soutien sans faille a été essentiel dans l'achèvement de ce projet. Un gros merci à Kim qui a été aux premières loges de mes états d'âmes mais qui a su y faire face et m'a apporté le sang-froid dont j'avais besoin.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
RÉSUMÉ	xii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I	
LA PHOTOSYNTÈSE	5
1.1 L'activité photosynthétique	5
1.1.1 Structure de la chaîne trophique photosynthétique	5
1.1.2 Structure du photosystème II	7
1.1.3 Dissipation de l'énergie issue des chlorophylles	11
1.1.4 La chaîne de transport d'électrons	13
1.2 Mesure de la photosynthèse	16
1.2.1 Paramètres généraux de mesure de la fluorescence	16
1.2.2 La cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne ...	17
1.2.3 La fluorescence chlorophyllienne modulée	20
1.3 Le glyphosate, un herbicide très répandu	22
1.3.1 Présentation générale	22
1.3.2 Mode d'action du glyphosate	23
1.3.3 Glyphosate, lumière et stress oxydatif	25
1.3.4 La lutte contre le stress oxydatif	27
1.4 Introduction écosystémique du phytoplancton	28
1.4.1 Rappel sur les efflorescences cyanobactériennes	28
1.4.2 Présentation de la daphnie	29

1.4.3 Les relations trophiques cyanobactéries / daphnie	30
CHAPITRE II	32
RÉPONSES PHOTOSYNTHÉTIQUES ET BIOCHIMIQUES DE L'ALGUE VERTE <i>SCENEDESMUS OBLIQUUS</i> ET DE LA CYANOBACTÉRIE <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> À UNE CONTAMINATION PAR UNE SOLUTION COMMERCIALE DE GLYPHOSATE	
2.1 Introduction	32
2.2 Matériel et Méthodes	34
2.2.1 Présentation des espèces utilisées	34
2.2.2 Mise en culture et exposition	35
2.2.3 Suivi de croissance	35
2.2.4 Mesures photosynthétiques	36
2.2.5 Mesure des Espèces Réactives de l'Oxygène	37
2.3 Résultats	40
2.3.1 Croissance cellulaire	40
2.3.2 Cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne	41
2.3.3 Mesure de la fluorescence chlorophyllienne modulée ...	45
2.3.4 Mesure des enzymes anti-oxydantes	50
2.4 Discussion	53
2.5 Conclusion	59
CHAPITRE III	61
THE INFLUENCE OF <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> ON <i>DAPHNIA MAGNA</i> FOOD ELECTIVITY AND GUT TRANSIT TIME	
3.1 Résumé	62
3.2 Abstract	63
3.3 Introduction	64
3.4 Methods	66
3.4.1 Phytoplankton	66

3.4.2	Zooplankton	67
3.4.3	Fluorescence measurements and experimental treatments	68
3.4.4	Assessment of food discrimination ability of Daphnia	69
3.4.5	Statistical analyses	70
3.5	Results	70
3.6	Discussion	72
3.7	References	77
3.8	Tables	85
3.9	Figures	86
CONCLUSION		89
RÉFÉRENCES		93

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1. Structure d'un chloroplaste et de l'empilement de thylacoïdes en grana	7
1.2. Représentation schématique de la chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse. De gauche à droite, les complexes membranaires sont le photosystème II, le cytochrome b ₆ f, le photosystème I, la plastocyanine et l'ATP synthase	8
1.3. Représentation schématique du photosystème II et de son centre réactionnel. (D1 et D2 : protéines structurelles du PSII; CP43 et CP47 : Protéines de l'antenne interne; Lhcb 1, 2, 3, 4, 5, 6 : protéines de l'antenne externe; Mn : Manganèse; Y _Z et Y _D : Tyrozine Z et D; Phe : Phéophytine; Q _A et Q _B : Quinone A et B; PHQ ₂ : Plastoquinone. (D'après Nield, 2003)	9
1.4. Structure moléculaire de la chlorophylle a (en haut) et du carotène (en bas)	11
1.5. Spectres d'absorption des pigments photosynthétiques	12
1.6. Voies de transfert d'énergie suite à l'excitation d'une molécule de Chlorophylle Chl (Müller, Li et Niyogi, 2001)	13
1.7. Exemple de cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne montrant les transitions O-J-I-P sur une échelle logarithmique	20
1.8. Voie de synthèse du chorismate (d'après Rawn (1989))	26
1.9. Génération des Espèces Réactives de l'Oxygène lors des étapes du transport d'électrons au sein du photosystème II	28
1.10. <i>Daphnia magna</i> au microscope (x30) (Kato <i>et al.</i> , 2011)	31
2.1. Taux de croissance (x10 ⁻²) à 96h des trois souches à l'étude en présence de l'herbicide Factor 540®. (Vert : <i>Scenedesmus obliquus</i> , Bleu : <i>Microcystis aeruginosa</i> non-toxique, Rouge : <i>Microcystis aeruginosa</i> toxique)	42

2.2.	Évolution des variables de fluorescence obtenues par les mesures au PEA pour <i>Scenedesmus obliquus</i> exposée à 6 concentrations (en mg.L ⁻¹) en Factor 540® a. ABS/RC ; b. TR ₀ /RC ; c. ET ₀ /RC et d. DI ₀ /RC	44
2.3.	Évolution de variables de fluorescence obtenues par PEA pour la souche non-toxique de <i>Microcystis aeruginosa</i> exposée à 6 concentrations (en mg.L ⁻¹) en Factor 540®. a. ABS/RC ; b. TR ₀ /RC ; c. ET ₀ /RC et d. DI ₀ /RC	45
2.4.	Évolution de variables de fluorescence obtenues par PEA pour la souche toxique de <i>Microcystis aeruginosa</i> exposée à 6 concentrations (en mg.L ⁻¹) en Factor 540®. a. ABS/RC ; b. TR ₀ /RC ; c. ET ₀ /RC et d. DI ₀ /RC	46
2.5.	Évolution des rendements photosynthétiques et du quenching non-photochimique chez l'algue verte <i>Scenedesmus obliquus</i> en présence de 5 concentrations (mg.L ⁻¹) de Factor 540®	48
2.6.	Évolution des rendements photosynthétiques et du quenching non-photochimique chez la souche non-toxique de <i>Microcystis aeruginosa</i> en présence de 5 concentrations (mg.L ⁻¹) de Factor 540®	49
2.7.	Évolution des rendements photosynthétiques et du quenching non-photochimique chez la souche toxique de <i>Microcystis aeruginosa</i> en présence de 5 concentrations (mg.L ⁻¹) de Factor 540®	50
2.8.	Activité de la CAT (U/mg prot.) chez les trois souches à l'étude à 24h et 96h en fonction de diverses concentrations en glyphosate (mg.L ⁻¹)	51
2.9.	Activité de l'APX (U/mg prot.) chez les trois souches à l'étude à 24h et 96h en fonction de diverses concentrations en glyphosate (mg.L ⁻¹)	52
2.10.	Activité de la SOD (U/mg prot.) chez les trois souches à l'étude à 24h et 96h en fonction de diverses concentrations en glyphosate (mg.L ⁻¹)	54

- 3.1. Example of a gut transit time (minutes) determination. The natural logarithm of the intra-gut fluorescence (F_0) is plotted against time. The GTT is calculated as $-1 / a$, where a is the slope of the linear regression of time versus $\ln(F_0)$. In this example, $a = -24.13$, and yields a GTT of ~27 minutes 87
- 3.2. Gut transit time (GTT; minutes) versus *D. magna* body length (mm). Animals were fed the green alga *S. obliquus* (black symbols) or the non-toxic cyanobacteria *M. aeruginosa* CPCC 632 (white symbols). There was no significant relationship between body size and GTT regardless of whether or not each diet was treated separately or when all GTT measurements were pooled 87
- 3.3. Comparison of *D. magna* GTTs corresponding to diets containing variable proportions of *S. obliquus* (% *S. obliquus*) and *M. aeruginosa* (% *M. aeruginosa*). Each bar represents the mean GTT (plus standard error, $n=3$) for each diet treatment. Grey bars are diet treatments which included non-toxic *M. aeruginosa* (CPCC 632) and white bars represent diet treatments using the toxic strain (CPCC 299). Letters a, b and c indicate significant differences between treatments ($\alpha = 0.05$)... 88
- 3.4. The ratio of of *S. obliquus* and *M. aeruginosa* in the intestine of *D. magna* exposed to each diet treatment following correction for the proportion of "green" signal arising from cyanobacteria degradation 89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1. Gut Transit Time values of <i>D. magna</i> in min:ss \pm standard error for each diet offered. CPCC 632 is the non-toxic strain of <i>M. aeruginosa</i> , CPCC299 is the toxic one. GTT for an exclusive diet of CPCC 299 was not assessable	86
3.2. Ivlev's Electivity Index for each diet. A value of 0 (zero) indicates not electivity. All values are significantly different of 0 indicating an electivity for <i>Scenedsemus obliquus</i>	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABS/RC	Absorption de la lumière par les LHCII
ATP	Adénosine triphosphate
APX	Ascorbate Peroxydase
CAT	Catalase
CDO	Complexe de dégagement d'oxygène
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophylle <i>b</i>
CO ₂	Dioxyde de carbone
CP	Complexe protéique
CPCC	Canadian Phycological Culture Center
CPCC 5	<i>Scenedesmus obliquus</i>
CPCC 632	Souche non-toxique de <i>Microcystis aeruginosa</i>
CPCC 299	Souche toxique de <i>Microcystis aeruginosa</i>
CR	Centre réactionnel
DI ₀ /RC	Dissipation de l'énergie non-photochimique par centre réactionnel
EPSPS	5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ET ₀ /RC	Flux de transport d'électron par centre réactionnel
F _s	Fluorescence variable induite par une illumination actinique continue
F _M	Fluorescence maximale induite par un flash saturant après adaptation à l'obscurité
F' _M	Fluorescence maximale induite par un flash saturant sous illumination actinique continue
F ₀	Fluorescence de base
F' ₀	Fluorescence de base obtenue par une lumière analytique modulée après illumination dans l'infrarouge
F _{50μs} , F _{2ms} , F _{30ms}	Intensité de fluorescence à 50 μs, 2 ms et 30 ms
F _J , F _I , F _P	Intensité de fluorescence à la transition J, I et P
F _v	Fluorescence variable
GTT	Temps de transit intestinal (<i>Gut Transit Time</i>)
<i>hν</i>	Lumière
kDa	kilodaltons
LHC	Complexe collecteur de lumière (<i>Light Harvesting Complexes</i>)
NADP, NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée, sous forme réduite
NPQ	Quenching non-photochimique

$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
PAM	« <i>Pulse Amplitude Modulated</i> »
PEA	« <i>Plant Efficiency Analyser</i> »
Phéo	Phéophytine
Φ_M	Rendement photochimique maximal du PSII
Φ'_M	Rendement photochimique des PSII ouverts
PQ, PQH ₂	Plastoquinone oxydée, réduite
PS	Photosystème
P680, P680*	Centre réactionnel à l'état stable et excité
Q _A	Quinone A
Q _B	Quinone B
qP	Quenching photochimique
SOD	Superoxyde dismutase
TR ₀ /RC	Quantité d'énergie lumineuse allouée à la séparation de charge du P680 par centre réactionnel actif
Z	Tyrozine Z

RÉSUMÉ

Lors des deux derniers siècles, la révolution agricole a vu un développement mécanique et chimique permettant d'améliorer les conditions de travail, mais aussi les rendements de production et donc les profits. Par exemple, l'utilisation de pesticides a permis de protéger les cultures d'agressions telles que la prédation, - mais aussi des maladies. Un herbicide tel que le glyphosate, permettant d'éliminer les plantes adventices a particulièrement fait l'objet de critique et été exposé médiatiquement. Son application sur des cultures qui lui sont résistantes permet en effet de détruire la quasi-totalité des organismes photosynthétiques non-désirables. Son épandage, parfois abusif, conjugué à des conditions météorologiques défavorables le conduit à avoir comme réceptacle ultime les milieux aquatiques naturels. S'en suit alors la perturbation des organismes photosynthétiques tels que les macrophytes, mais aussi le phytoplancton, premier chaînon de la chaîne trophique aquatique. D'une part, le glyphosate a pour cible des acides aminés essentiels, constitutifs entre autres des accepteurs d'électrons de la chaîne photosynthétique. Les expérimentations menées lors de ces travaux de maîtrise ont montré que l'efficacité de la photosynthèse, mesurée par fluorescence chlorophyllienne, est affectée à partir des concentrations de 1 mg.L^{-1} de glyphosate. D'autre part, la mesure de l'activité des enzymes anti-oxydantes a montré que les activités de la catalase, de l'ascorbate peroxydase et la superoxyde dismutase sont accrues après 24h d'exposition dès $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$. Ces activités sont significativement réduites après 96h probablement dues à une détoxification efficace des espèces réactives de l'oxygène ou à une efficacité réduite des enzymes antioxydantes. De plus, la modification de la communauté phytoplanctonique composée essentiellement d'algues vertes au profit de cyanobactéries entraîne une diminution du temps de transit intestinal. Deux hypothèses ont alors été retenues : les cyanobactéries, lubrifiées et moins digestes que les algues vertes, passent plus rapidement dans le tractus intestinal et sont moins digérées. Dans le cas des cyanobactéries toxiques, ces dernières ne semblent pas être ingérées. Les travaux menés ici appuient le constat que la daphnie est capable de discriminer sa nourriture au sein d'un mélange au profit de la plus bénéfique. Cette aptitude est toutefois amoindrie en présence d'une diète composée majoritairement de cyanobactéries.

Mots-clefs : Phytoplancton, algues vertes, cyanobactérie, herbicide, fluorescence, chlorophylle, stress oxydatif, temps de transit intestinal, électivité.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Notre planète connaît une course à la croissance qui ne semble pas avoir de limites depuis la fin du XIX^{ème} siècle et la révolution industrielle. Il s'agit pour les pays industrialisés de répondre à une demande d'une population elle aussi toujours en croissance et donc de produire toujours plus, toujours plus vite. De plus, dans un marché aussi concurrentiel, les pays émergents adoptent également ce modèle de croissance avec pour but ultime de gagner un poids décisionnel en matière de politique internationale (Hugon, 2014)

L'agriculture s'inscrit parfaitement dans cette dynamique. En effet, les progrès technologiques engendrent entre autre une croissance démographique et impose donc une réponse adéquate visant à nourrir les populations. Parmi ces innovations, deux catégories aux effets antagonistes peuvent être discernées : les engrais et les pesticides. L'utilisation d'engrais et de pesticides a été et est plus que jamais des facteurs majeurs de l'augmentation des productions agricoles. D'ailleurs depuis l'année 2000, la vente de pesticides s'est stabilisée mais s'élève tout de même à 40 Milliards de Dollars US par an pour une production mondiale qui s'élevait à plus de 2 400 000 tonnes en 2001 (USEPA, 2009).

Certes le traitement avec de tels produits doit permettre d'améliorer les rendements de production et de protéger les cultures et présente donc un argument majeur de vente, mais l'impact sur l'environnement d'un tel produit de synthèse peut être nocif voire destructeur. D'une part, la fertilisation des sols par les engrais et autres intrants augmente leur teneur en nutriments tels que l'azote et le phosphore. Une partie seulement est utilisée par les plantes cultivées, l'autre étant dispersée par les phénomènes météorologiques (lixiviation des sols et dispersion par les vents notamment). Les milieux aquatiques naturels se retrouvent alors les réceptacles ultimes de ces engrais qui provoquent leur eutrophisation. De plus, un apport massif de ces nutriments peut entraîner des efflorescences d'algues phytoplanctoniques et/ou de cyanobactéries résultant

sur un déséquilibre global de l'écosystème (Järvenpää et Lindström, 2004). Conjugués aux changements climatiques observés ces dernières années, le nombre d'épisodes d'efflorescences est prédit à la hausse, augmentant par la même la fréquence de perturbation des écosystèmes (Paul, 2008). Ce genre de phénomène devient d'autant plus problématique que certaines cyanobactéries sont aptes à produire des toxines et constitue alors directement une nocivité supplémentaire (Ziková et Kopp, 2008).

Les pesticides sont quant à eux regroupés en différentes classes en fonction des organismes qu'ils affectent, à savoir les insectes (insecticides), les champignons (fongicides) ou encore les plantes adventices (herbicides). Eux aussi sont reconnus pour leur efficacité agricole qui semble satisfaire les professionnels mais pose également la question de leur devenir dans l'environnement. En effet, même si ces produits ne sont pas censés être épandus lors de conditions météorologiques défavorables, le transport éolien et le lessivage de sols peuvent entraîner ces pesticides hors des zones cultivées, ultimement dans les milieux aquatiques naturels dans lesquels ils se concentrent (Biziuk *et al.*, 1996). Les travaux réalisés au cours de cette maîtrise se concentrent sur l'effet d'un herbicide et plus particulièrement sur une solution commerciale à base de glyphosate, composé actif de solutions commerciales domestiques et professionnelles comme le Round-Up®. Il s'agit de l'herbicide le plus vendu au monde (plus de 14 milliards de dollars US, British Agrochemical Association, 1996) principalement lié au fait du développement d'organismes génétiquement modifiés (OGM) capable de lui résister (semences dites Round-Up® Ready).

La société qui commercialise le Round-Up®, Monsanto, annonce sur le site internet de ce produit (<http://www.roundupservices.fr/>) que « le glyphosate inhibe une enzyme essentielle de la vie végétale et bloque ainsi la synthèse des acides aminés aromatiques ». L'enzyme évoquée est la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), essentielle dans la voie des shikimates qui

permet notamment la production d'acides aminés aromatiques constitutifs de nombreuses protéines de la chaîne photosynthétique. En cas de stress, l'organisme photosynthétique est alors limité dans sa capacité à synthétiser de nouvelles protéines et ainsi assurer une photosynthèse efficace. Finalement, le photosystème II étant affecté à divers endroits, c'est la photosynthèse dans son ensemble qui peut se retrouver affectée (DeLorenzo, Scott et Ross, 2001). Cependant les organismes photosynthétiques ont dû faire face à d'autres agressions bien avant avoir à subir les impacts anthropiques. Ils ont ainsi pu développer des systèmes de défense (Szigeti et Lehoczki, 2003) pour faire face par exemple aux rayonnements ultraviolets (Rao, Paliyath et Ormrod, 1996) ou de fortes intensités lumineuses (Ledford et Niyogi, 2005). En effet, si la quantité de lumière reçue par l'appareil photosynthétique est supérieure à sa capacité à l'assimiler, l'excédent énergétique peut causer un stress oxydatif, c'est-à-dire la création d'espèces réactives de l'oxygène, toxiques pour la cellule (Triantaphylidès et Havaux, 2009). La réponse en terme d'efficacité photosynthétique ainsi que le suivi du stress oxydatif suite à une contamination par une solution commerciale de glyphosate ont alors été observés au cours de ces travaux de maîtrise. La diminution de la production d'acides aminés essentiels de la chaîne photosynthétique laisse à prévoir une diminution de l'efficacité photosynthétique. Par voie de conséquence, il est attendu une augmentation du stress oxydatif et plus précisément des concentrations en espèces réactives de l'oxygène.

L'apport de nutriments (liés aux engrais) et/ou la modulation de l'activité photosynthétique (liés aux) pesticides décrits ci-avant peuvent engendrer la modification de la communauté phytoplanctonique. Certaines espèces peuvent décroître au profit d'autres espèces plus résistantes aux perturbations et/ou plus compétitives dans l'accès aux ressources. Les consommateurs directs du phytoplancton sont donc exposés à une diète alimentaire modifiée qui peut par

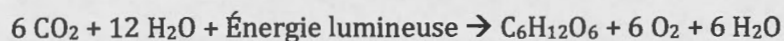
exemple entraîner des modifications en terme de survie et de taille des organismes constitutifs du zooplancton (Tillmanns *et al.*, 2008). Les travaux présentés ici visent à apporter des éléments de réponses quant au métabolisme alimentaire et le comportement de prédation de cladocères telles que les daphnies vis-à-vis de leur nourriture. Il s'agit d'une part d'appréhender la responsabilité de la toxicité d'une cyanobactérie dans son ingestion ou non par les daphnies mais également de mettre en évidence une possible potentiel d'électivité nutritif des daphnies c'est-à-dire une aptitude à discriminer sa nourriture au profit de la plus favorable nutritionnellement.

Chapitre I

LA PHOTOSYNTHÈSE

1.1. l'activité photosynthétique

Les organismes photoautotrophes sont des organismes générant leur propre énergie chimique nécessaire à leur métabolisme à partir de l'énergie lumineuse. Ce processus appelé « photosynthèse » est utilisé par les algues et les plantes supérieures ainsi que par certaines bactéries. La photosynthèse consiste en une chaîne de réactions chimiques et enzymatiques permettant la production de glucides ($C_6H_{12}O_6$) et de dioxygène (O_2) à partir de la photolyse de l'eau (H_2O) et de la réduction du dioxyde de carbone (CO_2). L'équation générique de la photosynthèse est de la forme (Taiz et Zeiger, 2010) :



Deux phases distinctes composent la photosynthèse. D'une part, l'énergie lumineuse induit des réactions photochimiques permettant la synthèse d'énergie chimique sous forme notamment d'adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) : c'est la phase lumineuse. Lors de l'autre phase, dite obscure, l'ATP et le NADPH sont utilisés pour la synthèse des glucides mais cette fois par des cycles biochimiques indépendants de la lumière tels que le Cycle de Calvin (Blankenship, 2002)

1.1.1 Structure de la chaîne de la chaîne photosynthétique

D'un point de vue structurel, la photosynthèse se déroule dans des organites de la cellule végétale ou algale appelées les chloroplastes (figure 1.1.) (Shimoni *et al.*, 2005). Ces derniers sont composés d'une bicouche lipidique permettant

d'isoler le *stroma* (intérieur du chloroplaste) du cytosol cellulaire. Ces membranes permettent des échanges actifs d'O₂ et de CO₂ mais aussi d'ions ou de glucides, produits de la photosynthèse. L'appareil photosynthétique lui-même se situe exactement dans les thylacoïdes situés dans les chloroplastes. Les thylacoïdes sont empilés les uns sur les autres en structures appelées *grana* et sont eux-aussi composés d'une bicouche lipidique délimitant alors le *lumen*. C'est dans ces membranes que se situe l'appareil photosynthétique lui-même.

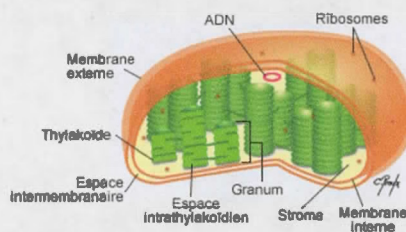


Figure 1.1. : Structure d'un chloroplaste et de l'empilement de thylacoïdes en grana (d'après Shimoni *et al*, 2005)

L'appareil photosynthétique est composé de quatre complexes protéiques permettant l'absorption de la lumière ou le transport des protons et des électrons photosynthétiques (Figure 1.2.) ; l'énergie lumineuse est captée par le complexe collecteur de lumière (LHC pour Light Harvesting Complex) composé de pigments chlorophylliens associés à des protéines membranaires. L'énergie est alors transférée vers le centre réactionnel (CR) où elle est utilisée pour oxyder l'eau. Les électrons résultants de cette oxydation empruntent alors la voie de transport qui les fait traverser successivement du photosystème II au complexe de cytochrome et enfin au photosystème I où ils sont utilisés pour la réduction du NADP⁺ en NADPH, source d'énergie chimique (Dekker et Boekema, 2005)

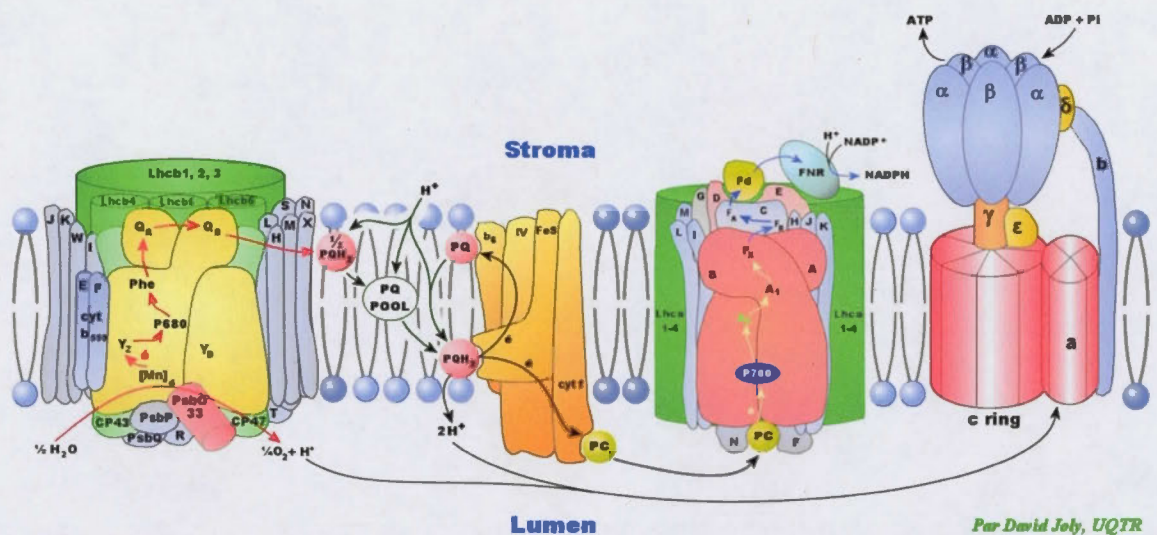


Figure 1.2. : Représentation schématique de la chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse. De gauche à droite, les complexes membranaires sont le photosystème II, le cytochrome b_6f , le photosystème I, et l'ATP synthase.
(d'après Carpentier, 2004)

1.1.2 Structure du photosystème II

- *Les antennes collectrices de lumière du photosystème II*

Le complexe antennaire du PSII est composé de deux sous-unités (figure 1.3) :

- l'antenne interne qui permet le transfert de l'énergie lumineuse vers le centre réactionnel. Elle est constituée de deux protéines, le CP43 et le CP47 auxquelles sont associées des molécules de chlorophylle a (Chla) et de β -Carotène (Barber et Kühlbrandt, 1999).

- l'antenne périphérique composée du complexe collecteur de lumière II (ou LHCII) ainsi que trois protéines CP24, CP26 et CP29. Ces dernières sont associées à des chlorophylle *a* et *b* et des caroténoïdes et permettent elles aussi le transfert d'énergie d'excitation du LHCII vers le centre réactionnel en passant par les CP43 et CP47 (Bassi, Sandonà et Croce, 1997)

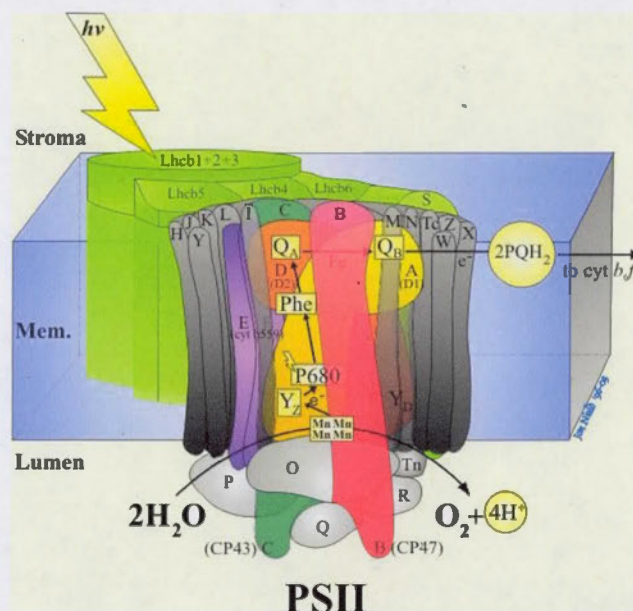


Figure 1.3. : Représentation schématique du photosystème II et de son centre réactionnel. (D1 et D2 : protéines structurales du PSII; CP43 et CP47 : Protéines de l'antenne interne; Lhcb 1, 2, 3, 4, 5, 6 : protéines de l'antenne externe; Mn : Manganèse; Y_Z et Y_D: Tyrosine Z et D; Phe : Phéophytine; Q_A et Q_B : Quinone A et B; PQH₂ : Plastoquinone. (D'après Nield, 2003).

La réaction de photo-oxydation de l'eau en elle-même est effectuée grâce au complexe de dégagement d'oxygène (CDO). Il s'agit d'un complexe enzymatique composé d'un tétramère de manganèse (Mn₄Ca) associé à trois protéines de poids moléculaires de 17, 24 et 33 kDa (De Las Rivas, Balsera et Barber, 2004).

En plus de sa fonction enzymatique, le CDO joue un rôle prépondérant dans la stabilité et le fonctionnement du PSII.

L'électron résultant de cette oxydation est alors captée par la Tyrozine Z, résidu de l'acide aminé du même nom. Celui-ci est en effet présent et joue un rôle majeur dans la cellule notamment en tant qu'élément constitutif de transporteurs d'électrons de la chaîne photosynthétique au même titre que la quinone A (Q_A) et la plastoquinone (PQ) (Fiedler, Soll et Schultz, 1982).

La tyrozine Z délivre alors son électron aux centres réactionnels situés sur deux protéines, D1 et D2 (poids moléculaires respectifs de 32 et 34 kDa), supports des pigments photosynthétiques ainsi que des transporteurs d'électrons associés au PSII. Au sein du CR se situent un complexe de deux molécules de chlorophylle *a* couplées, nommé P680 du fait de son absorbance maximale à 680nm (Govindjee et Coleman, 1990) qui permet la séparation de charge résultante de l'oxydation de l'eau. Du fait de sa fonction, le P680 est souvent utilisé pour désigner directement le centre réactionnel du PSII. Les électrons sont alors acheminés vers la phéophytine, premier accepteur d'électrons de la chaîne photosynthétique.

- *Absorption et utilisation de l'énergie lumineuse*

Les pigments photosynthétiques occupent plusieurs rôles dans l'absorption et le transfert de la lumière. En premier lieu, au niveau des antennes collectrices de lumières, les chlorophylles *a*, *b* ainsi que les caroténoïdes, dont les structures moléculaires sont illustrées en figure 1.4., assurent l'absorption de la lumière qui est transférée de pigment en pigment vers les centres réactionnels. Chaque pigment possède une longueur d'onde spécifique d'absorption et la combinaison des pigments permet de maximiser le spectre lumineux absorbable par la cellule

(figure 1.5.) (Govindjee et Govindjee, 1974). D'autres pigments tels que la phycocyanine ou la phycoérythrine sont spécifiques d'autres classes de phytoplancton telles que les cyanobactéries.

D'un point de vue physique, l'absorption d'un photon permet le passage rapide (10^{-15} s) d'un pigment photosynthétique à son état excité, c'est-à-dire son élévation à un niveau d'énergie supérieur (Larousse, 1971)

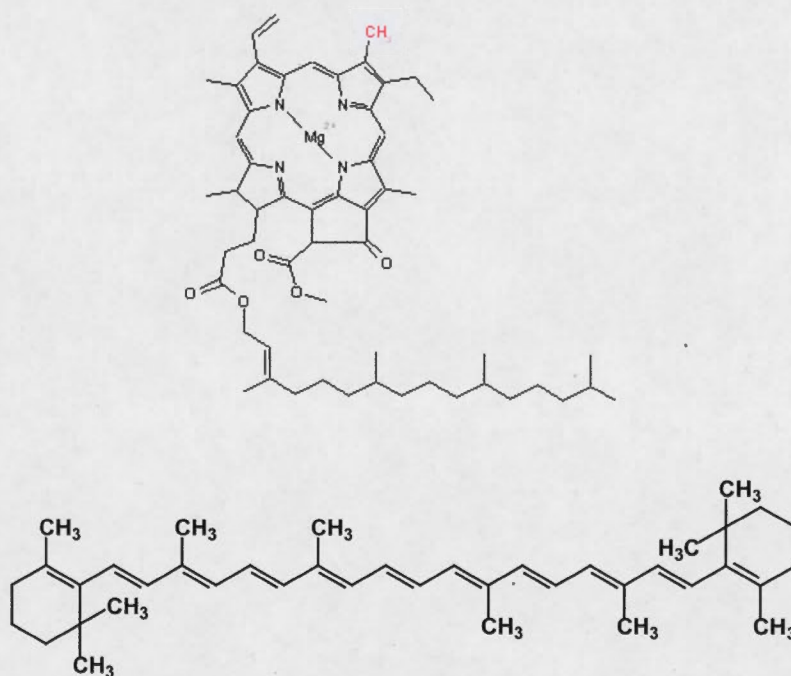


Figure 1.4. : Structure moléculaire de la chlorophylle *a* (en haut, d'après Erb, 2007) et de la carotène (en bas, d'après Evens, 2009).

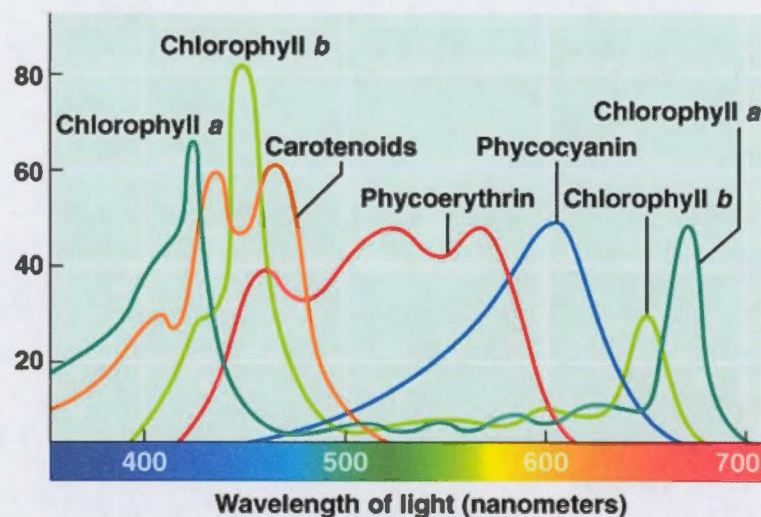


Figure 1.5. : Spectres d'absorption des pigments photosynthétiques (d'après Rawn, 1990)

Plus précisément, les chlorophylles, majoritaires dans les antennes collectrices de lumière, possèdent deux maximums d'absorption et deux états d'excitations. Dans les antennes collectrices de lumière, l'énergie est acheminée vers le P680 par son transfert d'une chlorophylle à l'autre par résonnance. Les molécules de chlorophylles doivent alors retrouver un état stable par diverses voies de dissipation de l'énergie afin d'être de nouveau opérationnel en vue de l'acceptation d'un nouveau photon.

1.1.3 Dissipation de l'énergie issue des chlorophylles

Il existe quatre façons pour la chlorophylle de retrouver son état stable et donc de réémettre son énergie (Figure 1.6.) : (1) Les réactions photochimiques initiales de la photosynthèse, (2) la dissipation non-photochimique sous forme de chaleur, (3) la fluorescence chlorophyllienne et (4) le transfert à une

molécule de dioxygène entraînant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Müller *et al.*, 2001)

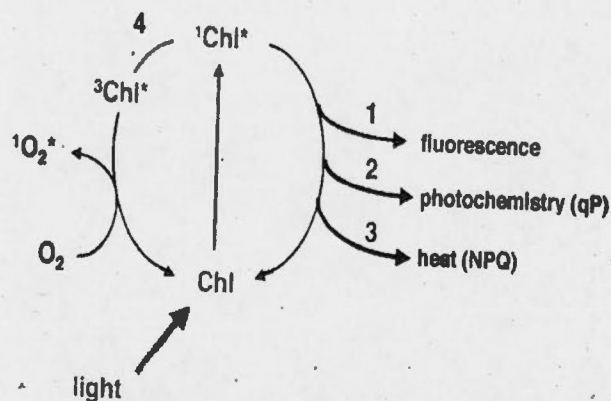


Figure 1.6 : Voies de transfert d'énergie suite à l'excitation d'une molécule de Chlorophylle (Müller *et al.*, 2001)

1. Émission de l'énergie par fluorescence
2. Utilisation pour la réalisation d'autres procédés photochimiques
3. Dissipation sous forme de chaleur
4. Passage à l'état triplet, permettant l'excitation des molécules d'O₂

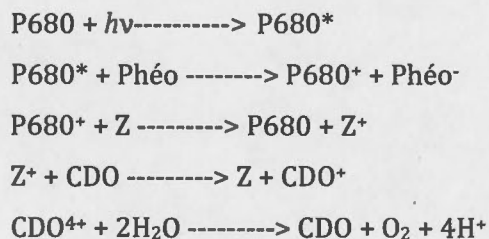
La dissipation de l'énergie *via* ces différentes voies se fait de manière équilibrée : la perte d'efficacité d'une des voies est compensée par les autres.

1.1.4 La chaîne de transport d'électrons

- *La séparation de charge*

Parmi les voies de dissipation de l'énergie, les réactions biochimiques constituent la voie ayant le plus d'intérêt pour la cellule. Il s'agit en fait de la photosynthèse *stricto-sensu* c'est-à-dire la production d'énergie chimique utilisable par la cellule à partir de l'énergie issue de la lumière.

Le transfert de l'énergie des antennes collectrices de lumière a élevé le P680 à son état excité P680*. Un électron provenant de celui-ci sera donc cédé à l'accepteur primaire d'électron : la phéophytine. Celle-ci passe à son tour à son état excité Phéo*. Le P680⁺ résultant de cette réduction comble alors sa lacune en électron en captant un du donneur primaire d'électron : la tyrozone (Z). Cette dernière remplaçant à son tour cet électron cédé par un électron provenant du complexe de dégagement d'oxygène (Raven *et al*, 2007). L'ensemble de ces réactions est résumé comme suit :



Le complexe de dégagement d'oxygène nécessite quatre séparations de charge afin d'effectuer la photolyse de l'eau, productrice de dioxygènes (Dekker et Van Grondelle, 2000).

Suite à la réduction de la phéophytine, l'électron libéré est transféré vers les quinones A (Q_A). Deux électrons provenant de Q_A se dirigent alors vers Q_B et les plastoquinones (PQ) qui y sont liées. Les PQ transfèrent ensuite leurs électrons

au cytochrome b_6f qui à son tour, par des réactions d'oxydoréduction sont transmises aux plastocyanines qui acheminent finalement les électrons vers le photosystème I (PSI)

- *Dissipation non-photochimique de l'énergie : la chaleur.*

Dans le milieu naturel, la quantité de lumière peut varier dans le temps et ce, de manière brusque (dissipation de nuages, effet diffractant de l'eau...) pouvant alors modifier la pression d'excitation du PSII. Chez les organismes photoautotrophes, la pression d'excitation peut être définie par les états relatifs d'oxydo-réduction de Q_A . Idéalement, il se crée un équilibre entre l'utilisation photochimique de l'énergie provenant de l'absorption de la lumière et la capacité à dissiper un éventuel excès énergétique par la chaleur *via* le quenching non-photochimique (Rosso *et al.*, 2009). La pression d'excitation est alors faible et le pool de PQ est à l'état oxydé. En revanche, dans de nombreux cas de stress environnementaux, la pression d'excitation est augmentée du fait d'un déséquilibre entre l'efficacité photosynthétique et la capacité à utiliser l'énergie qui en résulte. Une des résultantes de ce débalancement peut être un ajustement de la structure et de la composition des antennes collectrices de lumière (pour les algues vertes) ou des phycobilisomes (pour les cyanobactéries) (Ruban, Johnson et Duffy, 2012). Il ne faut de plus pas oublier que l'énergie excédentaire, si elle n'est pas suffisamment bien assimilée, peut à son tour entraîner la création de radicaux libres nocifs pour les pigments chlorophylliens qui composent les LHClI et les phycobilisomes (Müller, Li et Niyogi, 2001). Enfin, la présence d'un xénobiotique pourrait également affecter un ou plusieurs éléments constitutifs de l'appareil photosynthétique empêchant la prise en charge intégrale de l'énergie qui lui (leur) parvient (Choi, Berges et Young, 2012).

Dans tous les cas évoqués précédemment, évacuer l'énergie excédentaire est primordial pour la pérennité de la cellule phytoplanctonique. La principale voie de dissipation de l'énergie excédentaire est alors la forme non-photochimique, plus précisément sous forme de chaleur (Horton, Ruban et Walters, 1996).

Dans la pratique, cette dissipation d'énergie se fait essentiellement grâce aux changements de conformation successifs et réversibles des trois molécules constitutives du cycle des xanthophylles. Lors d'exposition à de fortes intensités, la violaxanthine subit une première dé-époxydation et devient alors l'antheraxanthine, qui a son tour subit le même sort et devient ultimement la zéaxanthine. Cette dernière est par ailleurs capable d'assimiler directement l'énergie excédentaire qui parvient aux antennes collectrices pour la dissiper à nouveau sous forme de chaleur (Demmig-Adams et Adams III, 1996). Cependant, le cycle des xanthophylles n'est pas retrouvé chez les cyanobactéries qui adoptent trois alternatives (Kirilovsky et Kerfeld, 2013). La première est dite « transition d'état » qui déplace les antennes collectrices de lumières vers le photosystème I afin de diminuer la chaîne de transport d'électron mais également l'efficacité énergétique de la photosynthèse. La seconde est l'utilisation des OCP (pour Orange Carotenoid Protein) qui prennent en charge les espèces réactives de l'oxygène. Enfin, la dissociation des phycobilisomes représente la troisième alternatives pour assimiler un maximum d'énergie lumineuse et limiter la perte d'énergie sous forme de chaleur. Enfin, chez les plantes supérieures, il a été démontré que la zéaxanthine n'est pas toujours associée au cycle des xanthophylles (Morosinotto *et al.*, 2003). Elle peut agir comme antioxydant lorsqu'elle est sous forme libre.

- *Dissipation de l'énergie sous forme de fluorescence*

D'une manière générale, l'exposition des pigments chlorophylliens à la lumière entraîne indubitablement une émission de fluorescence de leur part (Kautsky et Hirsch, 1931). D'ailleurs, l'intensité de la fluorescence émise est variable et spécifique : c'est « l'effet Kaustky ». Lors de stress environnementaux ou de perturbations physiologiques des cellules photosynthétiques, l'intensité de cette fluorescence est modulée dans le temps. Étant donné que la dissipation de l'énergie sous forme de fluorescence complète l'utilisation de l'énergie dans les processus photochimique et non-photochimique décrits précédemment, la mesure pratique de cette voie de dissipation s'est imposée comme un outil robuste de suivi des perturbations subies par la cellule photosynthétique (Juneau *et al.*, 2007). Plus précisément, une augmentation de la fluorescence chlorophyllienne (ou de la dissipation sous forme de chaleur) laisse présager d'une diminution de la photochimie et une perte d'efficacité dans la chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse.

1.2 Mesure de la photosynthèse

1.2.1 Paramètres généraux de mesure de la fluorescence

Les LHCII sont composées de divers pigments chlorophylliens, et c'est la fluorescence émise par la chl *a* qui est mesurée. D'autres pigments telles que la chlorophylle *b* sont accessoires et transmettent rapidement leur énergie d'excitation aux Chl *a* (Lazár, 1999). Lorsque l'appareil photosynthétique n'est pas sollicité, c'est-à-dire lorsque la cellule n'est pas exposée à la lumière, le niveau de fluorescence émis est appelé fluorescence de base (F_0). À l'opposée, la fluorescence maximale (F_M) est observée lorsque l'ensemble des accepteurs

d'électrons sont à l'état réduit (soit Q_A^- , Q_B^- et PQH_2), c'est-à-dire ayant captés les électrons issus du P680 (Papageorgiou *et al.*, 2007).

La fluorescence variable F_v , est alors la différence observée entre F_M et F_0 , c'est-à-dire la différence de fluorescence lorsque tous les centres réactionnels sont fermés ou ouverts. La fluorescence variable est donc liée directement à la capacité photochimique du PSII. La mesure des niveaux de fluorescence permet ainsi de traduire des dégradations structurelles ou fonctionnelles du PSII. Comme évoqué précédemment, l'évacuation de l'excédent d'énergie se fait sous forme de chaleur et sous forme de fluorescence. Le suivi de fluorescence permet donc de traduire l'efficacité d'assimilation de l'énergie par la chaîne de transport d'électrons : La diminution de F_v/F_M traduit une augmentation de la dissipation d'énergie par fluorescence et par conséquent une diminution de l'efficacité de l'appareil photosynthétique liée à une dégradation du PSII (Schreiber *et al.*, 1986).

Plus spécifiquement, deux méthodes permettent suivre la fluorescence chlorophyllienne afin de localiser précisément la perturbation au sein de la chaîne de transport d'électron : la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne et la mesure de la fluorescence chlorophyllienne modulée.

1.2.2 La cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne

La mesure de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne apporte des informations quand au fonctionnement et à la dissipation d'énergie au niveau du PSII.

Lors de l'exposition à la lumière, les accepteurs primaires d'électrons (Q_A) sont progressivement réduits, engendrant finalement le passage de F_0 à F_M (la fluorescence variable). Cette cinétique de fluorescence s'effectue en 1s et présente quatre états de transitions (F_0 , F_I , F_1 et F_P ; avec $F_P = F_M$ après

acclimatation à l'obscurité) observables lorsque représentées sur une échelle logarithmique (Figure 1.7.). La cinétique obtenue est connue sous le nom de cinétique OJIP en référence aux niveaux de transition. Chaque étape équivaut à un niveau d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons associés au PSII. Après le début de l'illumination ($t = 0 \mu\text{s}$), les transitions suivantes sont définies :

- à $50 \mu\text{s}$, la fluorescence est considérée comme étant la fluorescence de base F_0 (Strasser et Stirbet, 2001).
- à 2 ms , la phase J traduit la réduction des Q_A ($Q_A^-Q_B$) (Schreiber, Schliwa et Bilger, 1986)
- à 30 ms , l'état de transition I illustre le début de réduction des Q_B ($Q_A^-Q_B^-$) (Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995).
- la phase I-P traduit la seconde réduction de Q_B ($Q_A^-Q_B^{2-}$) (Strasser et Stirbet, 2001).
- à 500 ms (parfois plus tard) l'état de transition final P correspond à la réduction des PQ (PQH_2) (Vredenberg, 2000)

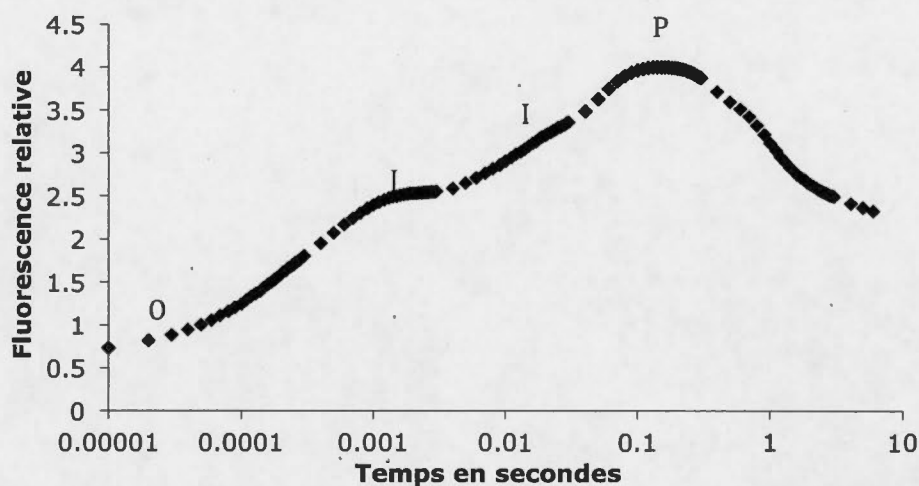


Figure 1.7. : Exemple de cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne montrant les transitions O-J-I-P sur une échelle logarithmique. (Figure tirée de travaux personnels).

Les valeurs de fluorescence observées à ces différents états de transition permettent d'évaluer plusieurs paramètres de fluorescence, témoins de l'état de fonctionnement global du PSII, que ce soit dans la chaîne de transport des électrons ou plus largement sur la forme de dissipation de l'énergie. Voici les paramètres retenus dans les travaux réalisés au cours de ce projet de maîtrise :

- Le rendement photochimique maximal du PSII, ϕ_M :

$$\phi_M = (F_M - F_{50\mu s}) / F_M \quad (\text{Strasser et al., 2004})$$

avec $F_{50\mu s}$ = fluorescence de base (F_0) et F_M = Fluorescence maximale = F_P

- L'absorption de la lumière par les LHCII, ABS/RC :

$$\text{ABS/RC} = M_0 / V_j / \phi_M \quad (\text{Force et al., 2003})$$

avec $M_0 = F_{300\mu s} - F_{50\mu s} / (F_M - F_{50\mu s}) \times 0,25$, vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable; $V_j = F_{2ms} - F_{50\mu s} / F_M - F_{50\mu s}$, taux de réduction des Q_A .

- La quantité d'énergie lumineuse allouée à la séparation de charge du P680 par centre réactionnel actif, TR_0 / RC :

$$TR_0 / RC = M_0 / V_f \quad (\text{Force et al., 2003})$$

- Le transport des électrons au delà de l'accepteur primaire (Q_A^-) par centre réactionnel actif RC, ET_0 / RC :

$$ET_0 / RC = (M_0 / V_f) \times (1 - V_f) \quad (\text{Force et al., 2003})$$

- La proportion de l'énergie lumineuse absorbée par CR actif mais dissipée sous forme de chaleur, DI_0 / RC :

$$DI_0 / RC = ABS / RC - M_0 / V_f \quad (\text{Strasser et al., 2000})$$

1.2.3 La fluorescence chlorophyllienne modulée

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne (Rohàček, 2002) via la fluorimétrie PAM (*Pulse Amplitude Modulated*) permet de mesurer le transport d'électrons dans le PSII ainsi que le transfert d'électrons du PSII vers le PSI. Elle permet de mesurer les paramètres relatifs à l'efficacité du transport d'électrons associé au PSII et par voie de conséquence, à la dissipation de l'énergie lumineuse.

La mesure consiste d'abord à adapter l'échantillon à l'obscurité pendant 15 min afin d'obtenir l'oxydation de tous les transporteurs d'électrons. Il est ensuite possible de mesurer les paramètres suivants :

- La fluorescence initiale (F_0) obtenue après exposition à une faible lumière dite lumière modulée analytique permettant de quantifier la dissipation d'énergie sous forme de fluorescence au niveau des LHCII sans pour autant induire de séparation de charge. Tous les centres réactionnels sont donc ouverts et les accepteurs primaires d'électrons de la photosynthèse (Q_A) sont tous oxydés (Schreiber et al., 1986).

- La fluorescence de base (F_s) obtenue après une exposition prolongée à la lumière actinique.
- La fluorescence maximale (F_M) et (F'_M) obtenue après exposition brève à un flash de lumière saturant après acclimatation à l'obscurité ou à la lumière, respectivement. Toutes les Q_A sont alors réduites.

À partir des mesures de fluorescence chlorophyllienne modulée, plusieurs paramètres reflétant l'efficacité du PSII et la dissipation de l'énergie lumineuse sous différentes formes peuvent être déterminés. Les paramètres retenus lors de ce projet sont les suivants :

- Le rendement photochimique maximal du PSII, ϕ_M

$$\phi_M = (F_M - F_0) / F_M = F_v / F_M \quad (\text{Butler et Kitajima, 1975})$$

- Le rendement photochimique opérationnel, ϕ'_M :

$$\phi'_M = (F'_M - F_s) / F'_M = F'_v / F'_M \quad (\text{Genty et al., 1990})$$

Ce paramètre permet de quantifier l'activité du PSII adapté à la lumière.

- Le quenching photochimique, qP :

$$qP = (F'_M - F_s) / (F'_M - F'_0) \quad (\text{Schreiber et al., 1986})$$

Il indique la capacité photochimique du PSII adapté à la lumière et quantifie la fraction de centre réactionnel du PSII qui sont ouverts c'est-à-dire avec les Q_A réoxydées.

- Le quenching non-photochimique, NPQ :

$$NPQ = (F_M - F'_M) / F'_M$$

Ce paramètre quantifie la diminution du F_M lors de l'adaptation de l'échantillon à la lumière actinique. Il permet de quantifier la dissipation d'énergie excédentaire par les voies non-photochimiques.

1.3 Le glyphosate, un herbicide très répandu

1.3.1 Présentation générale

Le N-(phosphonométhyl)glycine, plus connu sous le nom de glyphosate est devenu progressivement une des molécules chimiques les plus utilisées au monde. Il a été synthétisé pour la première fois en 1950 en Suisse par le chimiste Henri Martin (Franz *et al.*, 1997). C'est en 1970 que son potentiel herbicide est mis en évidence et en 1974, la société Monsanto[®] en développe une formulation commerciale : le Round-Up[®]. Le Round-Up[®] permet d'éradiquer toute plante adventice et de laisser un environnement dépourvu d'organismes photosynthétiques. Le succès de l'herbicide est total à partir des années 1990 lorsque Monsanto développe et commercialise des graines de maïs et de soya génétiquement modifiées résistantes au Round-Up[®] (dites « Round-up Ready[®] ») : les agriculteurs peuvent alors traiter leur champs contre les plantes adventices sans porter préjudice à leur culture (Duke et Powles, 2008 ; Franz *et al.*, 1997). Il devient même l'herbicide le plus vendu au monde évoluant logiquement en parallèle des ventes de semences transgéniques résistantes au glyphosate qui représentent aujourd'hui 80% du marché (Duke et Powles, 2008).

La tendance est la même au Canada et notamment au Québec, où le maïs et le soya transgénique ensemencés étaient respectivement de 62,5% et 49% (Santé Canada, 2011). Simultanément, les ventes de glyphosate ont augmenté de 670% entre 1992 et 2009 pour atteindre 35,2% des ventes totales de pesticides de la classe des acides phosphoniques, soit 1 402 762 kg. Cela en fait le pesticide le plus vendu au Québec (Gorse et Balg, 2012).

1.3.2 Mode d'action du glyphosate

Si l'efficacité du glyphosate en tant qu'herbicide est reconnue depuis longtemps, il n'en est pas de même pour son mode d'action. *In fine*, l'effet du glyphosate se retrouve sur l'efficacité de la chaîne photosynthétique et donc sur l'organisme et sa capacité à produire son énergie. Toutefois, le mode d'action précis sur la photosynthèse est resté longtemps inconnu du fait que ce processus n'est pas la cible directe. En effet, il faut les effets en amont sont à considérer, au niveau de la biochimie même de l'organisme photosynthétique. Il faut tout d'abord considérer le fait que cet herbicide est utilisé dans le traitement des plantes supérieures et qu'il est systémique, c'est-à-dire qu'il pénètre les organes de la plante pour rejoindre les points de croissance de l'ensemble de l'organisme (apex, méristème). Issa (1999) a montré que c'est à ces points de croissance que le glyphosate inhibe l'activité d'une enzyme, la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) bloquant ainsi la synthèse des acides-aminés aromatiques. La synthèse de vitamines et de métabolites secondaires s'en retrouve alors affectée, engendrant finalement la mort de la plante traitée.

D'une manière générale, même si ce mode d'action n'a pas été clairement mis en évidence, plusieurs effets ont cependant été répertoriés (Gomes *et al.*, 2014). Parmi les effets observés, une diminution de la synthèse *de novo* des quinones a été démontré par Dewick (1998), influant donc potentiellement directement le transport des électrons de la chaîne photosynthétique. L'inhibition de la synthèse des pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes), des acides gras ou encore des acides aminés ont également été rapportés par Fedtke et Duke (2005).

Deux acides-aminés sont d'ailleurs particulièrement concernés par ces effets : la tyrosine et la phénylalanine. Ceci est dû au fait que l'EPSPS, l'enzyme cible du glyphosate, est essentielle dans la voie des shikimates (Fuchs *et al.*, 2002). La

synthèse de 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate issue du shikimate-3-phosphate (figure 1.8.) est alors inhibée. Par voie de conséquence, la production de chorismate, molécule précurseur de la production de tyrosine et de phénylalanine, se retrouve elle aussi affectée. Finalement, une autre conséquence est l'accumulation de shikimate dans la cellule jusqu'à 80 fois supérieure dans les feuilles traitées au glyphosate (Fuchs *et al.*, 2002 ; Geiger *et al.*, 1986).

Comme évoqué précédemment la Tyrosine est un acide aminé prépondérant et déterminant dans la chaîne de transport d'électron de la photosynthèse. En effet, elle est le transporteur d'électron intermédiaire entre le complexe catalytique de manganèse et la chlorophylle photochimiquement active du P680.

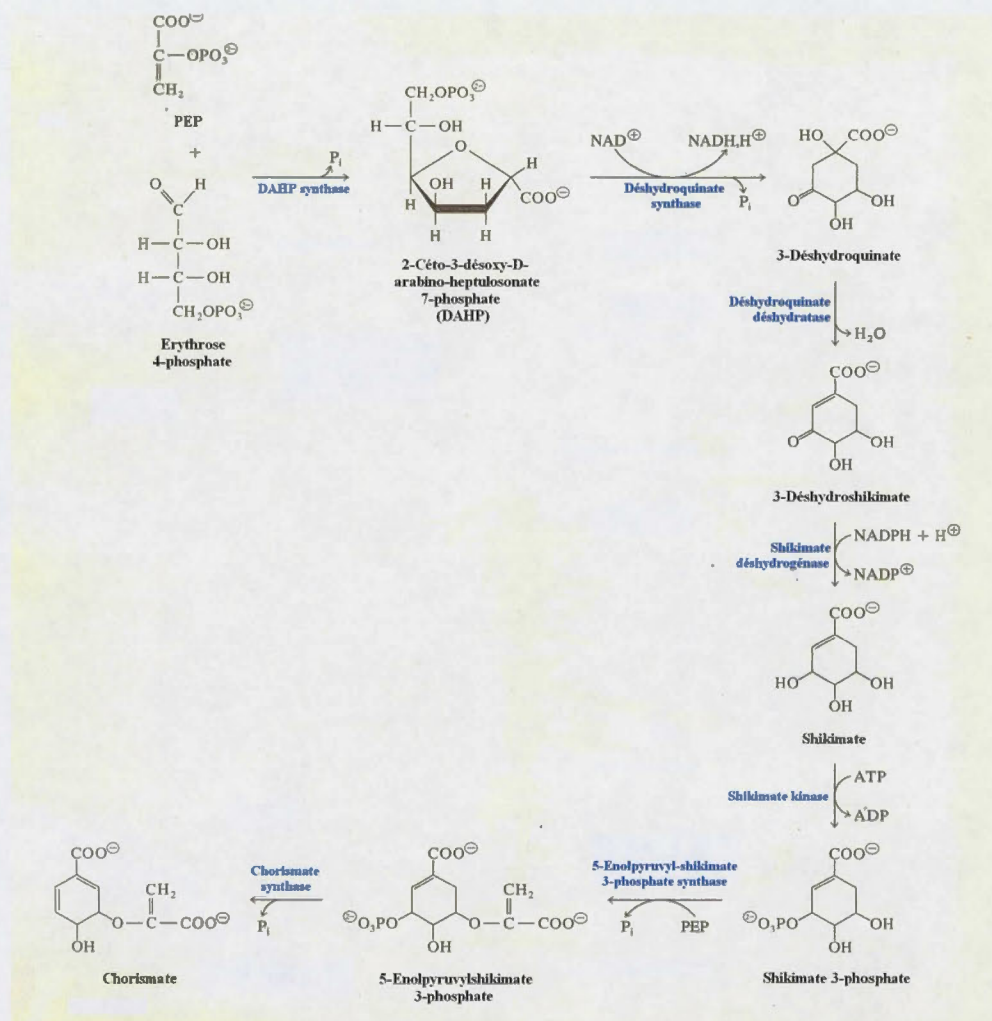


Figure 1.8. : Voie de synthèse du chorismate (d'après Rawn, 1989)

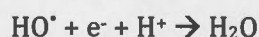
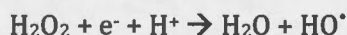
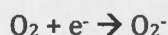
1.3.3 Glyphosate, lumière et stress oxydatif

Un dysfonctionnement dans la chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse est souvent dû à un transporteur qui perd l'intégralité ou une partie de sa fonctionnalité. Les électrons quittent alors la voie de la photosynthèse.

Lors de la dégradation d'un de ces transporteurs, moins d'électrons peuvent donc être pris en charge. Or de son côté, l'énergie lumineuse qui parvient aux antennes collectrices de lumière reste inchangée, elle devient donc en excès par rapport au potentiel d'assimilation de la cellule photosynthétique. Dans le cas des travaux présentés ici, c'est donc au niveau de la Tyroisine Z que se produit cette perte d'électrons. C'est alors que peut se produire un stress oxydatif (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001)

Les électrons non-pris en charge par les Z le sont alors par des molécules d'oxygène triplet (état stable électroniquement) qui se trouvent donc à leur tour sous forme de dioxygène singulet, c'est-à-dire à l'état excité. Il est également à noter qu'en cas de perturbation à un autre endroit de la chaîne photosynthétique tel qu'au niveau de la phéophytine, les électrons peuvent s'associer à une molécule de dioxygène créant ainsi l'ion superoxyde. L'impact du glyphosate sur les acides aminés aromatiques permet de retenir cette hypothèse qui affecterait *in fine* la structure et la régénération des molécules chlorophylliennes et des quinones (notamment Q_A et PQ) potentiellement affectées (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001).

Les molécules ainsi chargées sont alors appelées Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). Ces ERO sont produits à l'état normal mais en concentrations non nocives pour les cellules. Les plus fréquemment retrouvées sont l'ion superoxyde O₂⁻, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ ou encore le radical hydroxyle HO[•]. Les réactions menant à ces composés sont les suivantes (Fridovich, 1998 ; Pospíšil *et al.*, 2004) (Figure 1.9.) :



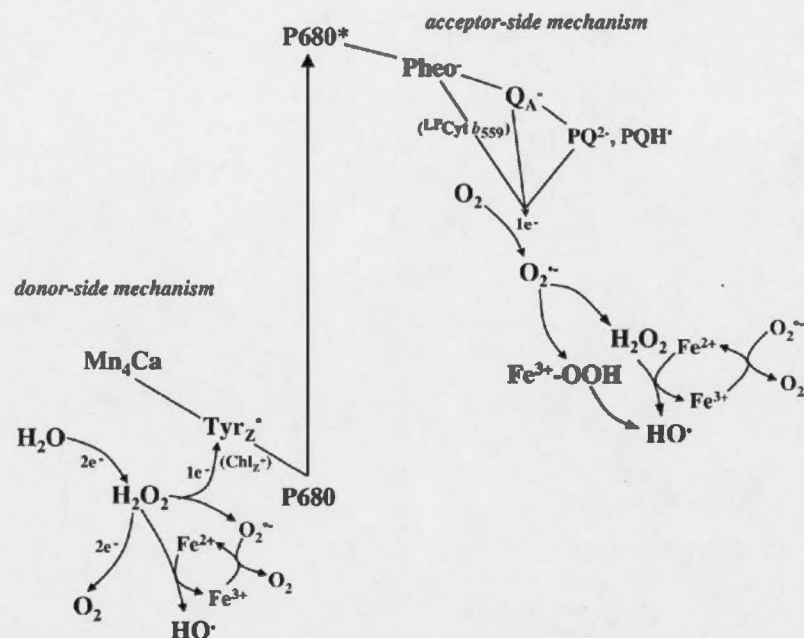


Figure 1.9. : Génération des Espèces Réactives de l'Oxygène lors des étapes du transport d'électrons au sein du photosystème II

Les effets de ces ERO sont multiples et variés : peroxydation des lipides, dommages à l'ADN et nombreuses interférences à la machinerie cellulaire.

1.3.4 La lutte contre le stress oxydatif

Les algues et les cyanobactéries sont capables de lutter elles-mêmes contre le stress oxydatif. Des composés tels que les carotènes, les zéaxanthines, les tocophérols ou les thiols sont reconnus pour prendre en charge les composés oxydants (Di Mascio *et al.*, 1990). De plus, ces organismes sont capables de produire des enzymes antioxydantes. Bon nombre ont été mises en évidence (Mallick et Mohn, 2000) et parmi elles :

- La superoxyde dismutase (SOD) permettant de réduire l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Wolfe-Simon *et al.*, 2005)
- La catalase (CAT) qui permet de réduire le H_2O_2 en eau et en O_2 (Pinto *et al.*, 2003)
- L'ascorbate peroxydase (APX) qui permet la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau (Pinto *et al.*, 2003)

La mesure de ces éléments peut alors s'avérer être un bon outil dans l'investigation des effets des herbicides, en complément des mesures d'efficacité photosynthétique (Olesen et Cedergreen, 2010 ; Ralph, 2000). Dans la mesure où l'organisme photosynthétique peut répondre, au moins en partie, au stress oxydatif par une production accrue d'enzymes antioxydantes, pas ou peu d'effets peuvent être identifiés par la seule mesure de la photosynthèse.

1.4 Introduction écosystémique du phytoplancton

À l'échelle écosystémique, le phytoplancton représente le premier maillon d'une chaîne trophique, désigné également par le terme de producteur primaire. Leur prédateur composé essentiellement de zooplancton représente le consommateur primaire.

1.4.1 Rappel sur les efflorescences cyanobactériennes

Lors d'une perturbation tel qu'un apport en nutriments (issus de fertilisants notamment) ou en matière organique, la concentration en phytoplancton peut accroître et un phénomène d'eutrophisation peut en résulter. De plus, dans ces circonstances, ce sont souvent d'autres organismes photosynthétiques unicellulaires, plus compétitifs qui les remplacent : les cyanobactéries,

couramment connues sous le nom d'algues bleu-vert. Celles-ci sont des bactéries tirant également leur énergie de la photosynthèse mais qui sont plus compétitives dans l'accès aux ressources notamment à la lumière (Richardson *et al.*, 1983 ; Shapiro, 1973). Un autre problème majeur engendré par les cyanobactéries est l'aptitude de certaines d'entre elles à produire des toxines, appelées cyanotoxines, affectant directement les autres organismes présents dans l'écosystème.

Les cyanotoxines peuvent être divisées en trois catégories en fonction de leur mécanisme de toxicité (Funari et Testai, 2005)

- les cytotoxines.
- les neurotoxines.
- les hépatotoxines
- les endotoxines.

Lors de ces travaux, une seule espèce de cyanobactérie a été utilisée. Le choix s'est porté sur *Microcystis aeruginosa* du fait de sa prévalence importante dans les milieux tempérés. Les toxines produites par cette espèce sont appelées les microcystines, qui sont des hépatotoxines.

1.4.2 Présentation de la daphnie

Le zooplancton recouvre une vaste diversité d'animaux en terme de taille mais il est très souvent associé aux premiers consommateurs d'une chaîne trophique. Se situant tout en bas de cette chaîne alimentaire, le cladocère *Daphnia magna*, communément appelé daphnie (figure 1.10.), est un consommateur primaire, c'est-à-dire qu'il puise son énergie directement du phytoplancton qu'il consomme (Ricklefs et Miller, 2003). De ce fait, les daphnies jouent un rôle important dans la régulation des populations de phytoplancton. La daphnie a été choisie comme modèle d'étude car elle est un organisme fréquemment utilisé

dans les études en écotoxicologie et dont les mécanismes métaboliques et comportementaux sont très bien connus.



Figure 1.10. : *Daphnia magna* au microscope (x30) (d'après Kato *et al.*, 2011)

1.4.3 Les relations trophiques cyanobactéries / daphnies

Lors d'épisodes d'efflorescences, les daphnies se retrouvent *de facto* exposées à la toxicité des cyanobactéries. De nombreuses études relatent alors des conséquences sur la survie des daphnies (Ferrão-Filho *et al.*, 2000), la croissance (Alva-Martínez *et al.*, 2004), la reproduction et la longueur du corps (Lürling, 2003a, 2003b) ou encore le taux d'ingestion (Rohrlack *et al.*, 1999 ; Rohrlack *et al.*, 1999). Toutefois la toxicité seule ne suffit pas à expliquer l'effet des cyanobactéries sur les daphnies. En effet, les microcystines administrées seules n'affecte pas le cladocère (Lürling et Van der Grinten, 2003) ou doivent être présentes à de très fortes concentrations pour provoquer un effet (Demott *et al.*, 1991). Une revue de littérature réalisée par Gulati et Demott (1997) montre en fait trois autres paramètres pouvant influencer la modulation de l'effort de prédation des daphnies sur le phytoplancton :

- la taille et la forme des cellules phytoplanctoniques
- les réponses morphologiques et métaboliques aux particules ingérées (Rohrlack *et al.*, 1999)
- la qualité nutritionnelle du phytoplancton, variable d'une espèce à une autre.

D'une manière générale, Wilson et ses collaborateurs (2006) montre également que le comportement de nutrition du zooplancton est souvent en faveur d'une diète composée de chlorophycées ou de dinoflagellés au détriment des cyanobactéries. De plus, en s'appuyant sur 66 études, ils ont montré que la présence de cyanotoxines n'influe pas de manière significative sur le comportement de nutrition. Les travaux réalisés au cours de ce projet de maîtrise visent à confronter ce constat au cas particulier des daphnies.

Chapitre II

RÉPONSES PHOTOSYNTHÉTIQUES ET BIOCHIMIQUES DE L'ALGUE VERTE *SCENEDESMUS OBLIQUUS* ET DE LA CYANOBACTÉRIE *MICROCYSTIS* *AERUGINOSA* À UNE CONTAMINATION PAR UNE SOLUTION COMMERCIALE DE GLYPHOSATE.

2.1 Introduction

La systématisation de l'utilisation d'engrais et de pesticides dans l'agriculture moderne peut engendrer des modifications d'ordres biologiques (espèces, communautés bactériennes...) (Leboulanger *et al.*, 2009 ; Pérez *et al.*, 2007), chimiques (variations de pH, teneur nutritive, Bending, Lincoln et Edmondson, 2006) et même physiques (structure des sols, Gevaio, Semple et Jones, 2000). Des pesticides épandus lors d'épisode venteux ou pluvieux (pratique pourtant déconseillée voire interdite) se retrouvent facilement dans les milieux naturels environnant les cultures traitées. L'utilisation d'un herbicide tel que le glyphosate peut particulièrement s'avérer problématique puisqu'il est dit non-sélectif, c'est-à-dire qu'il n'agit pas uniquement sur une espèce cible mais dans ce cas, potentiellement sur l'ensemble des organismes photosynthétiques (Annett *et al.*, 2014). Le plancton végétal présent dans les milieux aquatiques naturels peut donc se retrouver exposé à une contamination de pesticides. Son métabolisme ainsi que l'ensemble de la structure de la communauté phytoplanctonique peuvent alors s'en trouver modifiés. (Saxton *et al.*, 2011). Comme évoqué précédemment, un impact sur la chaîne photosynthétique engendre *in fine* un stress oxydatif (Olesen et Cedergreen, 2010).

Pour limiter les effets néfastes d'une telle contamination sur la photosynthèse mais également sur l'intégrité même de la cellule phytoplanctonique, il a été présenté précédemment la capacité des organismes phytoplanctoniques à évacuer plus efficacement l'énergie en excès par les voies non-photochimiques.

Dans le cas d'une réponse photosynthétique diminuée et/ou insuffisante, la synthèse et l'activité de molécules antioxydantes peut permettre de limiter les effets nocifs (Di Mascio *et al.*, 1990 ; Mallick et Mohn, 2000). Il existe de nombreuses études concernant l'impact d'un herbicide sur le phytoplancton mais la spécificité des travaux accomplis ici repose sur le suivi de l'activité d'enzymes antioxydantes (catalase, ascorbate peroxydase et superoxyde dismutase) de cette espèce d'algue verte (*Scenedesmus obliquus*) ou de cette cyanobactérie (*Microcystis aeruginosa*) suite à une contamination par une solution commerciale de glyphosate. Le choix des activités enzymatiques mesurées reposent sur le fait qu'elle ont été démontrées sensibles au stress oxydatif. L'algue verte *Scenedesmus obliquus* a montré une activité enzymatique exacerbée lors d'une contamination par le flumioxazine (Geoffroy *et al.*, 2003), alors que l'expression génique codante pour la synthèse d'ascorbate peroxydase s'est révélée être un bon indicateur du stress oxydatif chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Jamers et De Coen, 2010). Cependant l'activité même de l'ascorbate peroxydase ne s'est pas avérée être un bon indicateur du stress oxydatif (Geoffroy *et al.*, 2013). Enfin, l'activité de la superoxyde dismutase a permis de mettre en évidence le stress oxydatif engendré chez *Chlorella vulgaris* par une contamination par un autre herbicide, le paraquat (Qian *et al.*, 2009). Les travaux menés ici permettent donc d'identifier la qualité de ces trois activités enzymatiques spécifiques en réponse à une contamination par le glyphosate.

L'objectif de ce chapitre est donc d'investiguer l'impact du Factor 540®, herbicide ayant pour molécule active le glyphosate, sur la croissance, mais surtout la photosynthèse et la réponse antioxydante du phytoplancton. Pour ce faire, une algue verte, *Scenedesmus obliquus* et une cyanobactérie, *Microcystis aeruginosa* (souche toxique et non-toxique) ont été utilisées afin de mettre en relief de possibles différences d'efficacité de réponse face à une telle agression. La contamination par l'herbicide laisse à prévoir une diminution de l'efficacité

de la photosynthèse. En effet, la modulation de la synthèse d'acides aminés constitutifs des protéines de la chaîne de transport d'électrons pourrait engendrer une capacité réduite des transporteurs (en particulier la Tyroisine Z) à acheminer la quantité d'énergie qui leur parvient. Les électrons non pris en charge engendrent alors la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), molécules nocives pour les protéines notamment. Une production de molécules antioxydantes est alors attendue afin de neutraliser l'effet de ces ERO et assurer la pérennité de la cellule photosynthétique.

2.2. Matériel et Méthodes

2.2.1 Présentation des espèces utilisées

L'impact de la solution commerciale de glyphosate sur le phytoplancton s'est effectué sur une algue verte et sur une cyanobactérie. L'algue verte était *Scenedesmus obliquus* (CPCC 5, Kützing, 1833) de la classe des chlorophycées. La cyanobactérie était *Microcystis aeruginosa* (Kützing, 1833) de la classe des cyanophycées.

Ces deux espèces ont été choisies car elles sont couramment utilisées dans la recherche scientifique, permettant donc la comparaison avec des études réalisées ultérieurement.

D'autre part, deux souches différentes de *M. aeruginosa* ont été étudiées : une souche ne produisant pas de toxine (CPCC 632) et une souche toxique (CPCC 299). Les cyanotoxines produites par cette espèce sont des microcystines.

Toutes les espèces proviennent de l'Université de Waterloo (Ontario, Canada).

2.2.2 Mise en culture et exposition

Le phytoplancton a été cultivé dans le milieu de culture COMBO (Kilham *et al.*, 1998). Des cultures mères des trois souches de phytoplancton ont été acclimatées pendant plusieurs mois à une lumière de $125 \mu\text{mol}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ et à une température de 24°C sous un cycle d'illumination circadien de 12h/12h (jour/nuit).

Ces cultures ont été utilisées pour initier les expériences à une concentration de $4.10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$ pour les algues vertes et $1.10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ pour les cyanobactéries. Il s'agissait de débiter l'expérimentation avec suffisamment de matériel biologique tout en prenant garde à ne pas rendre limitant les nutriments du milieu de culture en fin d'expérience.

Six traitements à des solutions commerciales de glyphosate ont été appliqués. La formulation choisie se présente sous forme de sel de glyphosate, se nomme Factor 540® et provient de la compagnie IPCO®. Les concentrations en glyphosate étaient de 0,1 ; 0,3 ; 0,6 ; 1 et 2 mg.L^{-1} .

Toutes les cultures sont réalisées en triplicat.

2.2.3 Suivi de croissance

La mesure du taux de croissance (μ) est effectuée par un dénombrement cellulaire par un compteur de particule Multisizer™ 3 COULTER COUNTER (Beckman Coulter, Inc.). Le taux de croissance est calculé selon la formule :

$$\mu = [\ln(\text{nombre de cellules } (t_2)) - \ln(\text{nombre de cellules } (t_1))] / (t_2 - t_1)$$

Avec t_1 = temps précédant l'exposition à l'herbicide

Et t_2 = temps après le début de l'exposition à l'herbicide (i.e. : 24h, 48h, 72h ou 96h)

Le taux de croissance μ est alors rapporté au taux de croissance témoin, c'est-à-dire dans des conditions dépourvues d'herbicide.

2.2.4 Mesures photosynthétiques

Les mesures photosynthétiques ont été réalisées à $t=0h$, 24h, 48h, 72h et 96h. Deux mesures ont été effectuées : une cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne à l'aide d'un PEA (pour Plant Efficiency Analyser) (Hansatech Instruments, Royaume-Uni) et la fluorescence chlorophyllienne modulée mesurée à l'aide d'un water-PAM (pour Pulse Amplitude Modulation) (Walz, Allemagne) (cf. Chapitre 1.) Les trois paramètres retenus pour cette dernière mesure sont : le rendement photochimique maximal du PSII (ϕ_M), le rendement photochimique effectif des PSII (ϕ'_M) et le quenching non-photochimique (NPQ, c'est-à-dire l'énergie dissipée sous forme de chaleur. Ils ont été obtenus par une cinétique de type « Light Curve » où l'échantillon est exposé à des flashes de lumière d'intensité croissante (1, 82, 125, 188, 276, 427, 635, 906 et 1265 $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) toutes les 30s.

Préalablement à ces deux mesures, les échantillons ont été acclimatés à l'obscurité afin d'oxyder tous les transporteurs d'électrons de la chaîne photosynthétique.

2.2.5 Mesure des Espèces Réactives de l'Oxygène

- *Préparation des échantillons*

Les mesures de stress oxydatif ont été réalisées à $t=0$, 24h et 96h. Un volume de 50mL des suspensions algales présentées précédemment a été centrifugé à 15 000 g pendant 15min à 4°C avant d'être resuspendu dans 1mL de tampon phosphate de sodium. Afin de réaliser ultérieurement les mesures de protéines et d'enzymes anti-oxydantes, des aliquots de 200 μ L sont conservés à -80°C.

- *Mesure des protéines totales*

Les activités enzymatiques doivent être directement rapportées à la concentration protéique d'où l'importance de quantifier l'ensemble des protéines. Le dosage est réalisé selon la méthode de Bradford (1976). L'échantillon est décongelé puis les cellules sont lysées par sonication (sonicateur Sonifier® Geneq Inc.©) à une intensité de 10 %, 3 fois 30 secondes. Ils sont ensuite centrifugés à 15000 g pendant 30 min. Une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) est utilisée pour la courbe étalon permettant de déterminer la concentration des échantillons. La mesure s'effectue dans une microplaque de 96 puits par l'ajout de 120 μ L de tampon phosphate et 40 μ L de réactif de Bradford à 40 μ L d'échantillon. Après agitation et incubation pour 5 min, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 595 nm.

Il est à noter que pour chaque échantillon de dosage enzymatique, une mesure de la concentration en protéines totales a été réalisée afin d'appliquer le même biais au dosage (enzyme) et à son référentiel d'activité (concentration en protéines).

- *Mesure de la catalase (CAT)*

La catalase se trouve dans le cytosol des cellules et est un catalyseur de la décomposition du peroxyde d'hydrogène. Le principe de ce dosage est de suivre cette décomposition par la diminution de l'absorbance à 240nm (Aebi, 1984).

Dans une cuvette de spectrophotomètre, 150 µL d'échantillon sont ajoutés à 1750 µL de tampon phosphate et constitue le blanc. La réaction commence à l'ajout de peroxyde d'hydrogène H₂O₂. La cinétique est suivie pendant 3min à 240 nm.

L'activité de la catalase (exprimée en U/mg prot) se calcule comme suit :

$$\begin{aligned}\text{CAT} &= (\text{Pente} \times \text{dilution}) / (\text{Coefficient d'extinction molaire} \times [\text{protéine}]) \\ &= (\text{Pente} \times \text{dilution}) / (39,4 \times [\text{protéine}])\end{aligned}$$

- *Mesure de l'Ascorbate Peroxydase (APX)*

Cette enzyme se trouve dans le chloroplaste et est le principal chélateur du peroxyde d'hydrogène. L'ascorbate peroxydase utilise l'ascorbate comme donneur d'électron pour catalyser la conversion du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en eau H₂O.

Le principe de dosage repose sur la méthode développée par Nakano et Asada (1981) et ajustée par Dewez *et al.* (2005). Dans une cuvette de spectrophotomètre, 1450 µL de tampon phosphate de sodium ainsi que 100 µL d'ascorbate de sodium sont ajoutés à 350 µL d'échantillon. La réaction débute à l'ajout de 100 µL de peroxyde d'hydrogène H₂O₂. La diminution de l'absorbance est suivie pendant 3 min à 290 nm.

L'activité de l'ascorbate peroxydase (exprimée en U/mg prot) est définie comme suit :

$$\begin{aligned} \text{APX} &= (\text{Pente} \times \text{dilution}) / (\text{Coefficient d'extinction molaire} \times [\text{protéine}]) \\ &= (\text{Pente} \times 60) / (2,8 \times [\text{protéine}]) \end{aligned}$$

- *Mesure de la Superoxide Dismutase (SOD)*

Il s'agit d'une metalloprotéine qui catalyse la dislocation du radical superoxide libre (O_2^-) en oxygène (O_2) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il existe plusieurs isozymes de la SOD, dont la Fe-SOD, Mn-SOD et la Zn/Cu-SOD qui occupent des sites intracellulaires spécifiques. Par sa grande instabilité moléculaire, l'activité de la SOD ne peut pas être mesurée directement tel qu'effectué pour la catalase et l'ascorbate peroxydase.

La méthode utilisée est basée sur les travaux de Beyer Jr et Fridovich (1987). Les échantillons subissent 5 dilutions successives avec du tampon de réaction proposant alors une gamme de 1/1 ; 1/2 ; 1/5 ; 1/10 ; 1/20. Chaque dilution est dosée en triplicat (3 x 50 μL) dans une microplaque de 96 puits. Dans chaque puits, 200 μL de tampon de réaction sont introduits puis, au noir, 50 μL de tampon d'extraction. Chaque dilution est alors ajoutée en triplicat (3 x 50 μL). Enfin, 50 μL de riboflavine sont ajoutées. En protégeant de la lumière, les plaques sont lues au spectrophotomètre au temps $t=0$ à 560nm. Les plaques sont ensuite exposées à 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour 20min avant d'être lues à nouveau à 560nm. L'absorbance réelle est alors définie par la différence entre ces deux mesures à $t=0$ et $t=20\text{min}$.

Puis la EC_{50} est définie grâce au logiciel GraphPad Prism par une analyse de type « log(inhibitor) Vs Response – Variable slope » et rapportée à la concentration en protéine totale. Le lissage mathématique utilisé est de la forme :

$$Y = \text{Abs}_{\text{Max}} / ((1+10)^{(\log \text{EC}_{50} - X) \times \text{pente}})$$

Avec Max = Maximum d'absorbance

Y = Absorbance de l'extrait

X = Quantité d'extrait

Pente = pente maximum

2.3. Résultats

2.3.1 Croissance cellulaire

La figure 2.1. montre les taux de croissance μ des trois espèces de phytoplancton de cette étude exposées à 6 concentrations de solution commerciale de glyphosate. D'une manière générale, les trois souches présentent une résistance à l'herbicide jusqu'à 1mg.L^{-1} . À partir de 2 mg.L^{-1} , la croissance est significativement affectée.

Il est à noter que les trois espèces présentent le même taux de croissance interspécifique jusqu'à $0,3\text{ mg.L}^{-1}$. Ensuite ces taux de croissance sont significativement différents. Le classement des espèces de la moins sensible à la plus sensible se fait comme suit : *M. aeruginosa* (CPCC299, toxique) < *S. obliquus* (CPCC5) < *M. aeruginosa* (CPCC632, non-toxique).

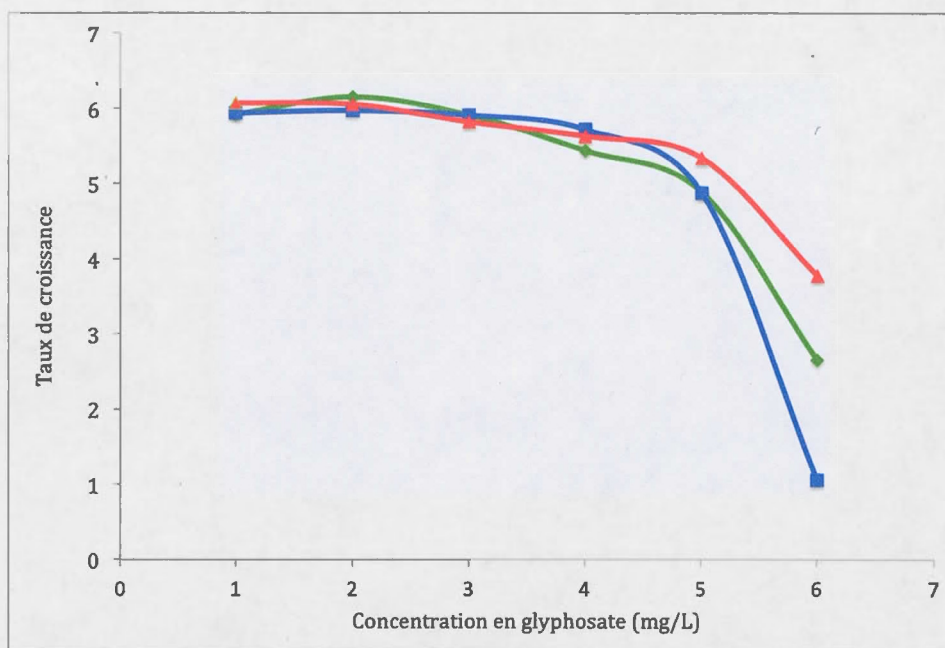


Figure 2.1. : Taux de croissance ($\times 10^{-2}$) à 96h des trois souches à l'étude en présence de l'herbicide Factor 540®. (Vert : *Scenedesmus obliquus*, Bleu : *Microcystis aeruginosa* non-toxique, Rouge : *Microcystis aeruginosa* toxique).

2.3.2 Cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne

L'augmentation de la concentration en glyphosate entraîne systématiquement une augmentation significative du paramètre ABS/RC dans les 48h après l'exposition. En effet, la figure 2.2. montre que ce paramètre est augmenté de 24% chez l'algue verte mais surtout de 85 et 45 % respectivement pour la cyanobactérie non-toxique (Figure 2.3.) et toxique (Figure 2.4.). Pour 72 et 96h, ce paramètre décroît et montre des valeurs similaires à celles observés dans des échantillons moins concentrés en glyphosate.

Le paramètre TRO/RC montre des niveaux plus importants pour les cyanobactéries que pour les algues vertes. D'autre part, le niveau général de

TRo/RC présente une tendance à diminuer dans le temps, c'est-à-dire moins élevé à 96h qu'à 24h. Toutefois, l'augmentation de la concentration en glyphosate semble engendrer des niveaux supérieurs de TRo/RC.

Concernant le ETo/RC, il augmente avec la concentration en glyphosate pour l'algue verte *S. obliquus* mais ne montre pas de variation au cours du temps (Figure 2.1.). À l'inverse, il reste stable pour la cyanobactérie toxique ou non-toxique (Figures 2.2. et 2.3.) , à l'exception d'une exposition à 2mg.L^{-1} pour la cyanobactérie non-toxique (CPCC632). De plus, le paramètre ETo/RC augmente dans le temps pour les deux souches de cyanobactéries.

Enfin, le paramètre DIo/RC présente la même tendance pour les 3 espèces de phytoplanctons : une exposition à des plus fortes concentrations en glyphosate (2mg.L^{-1}) provoque un pic de DIo/RC qui s'atténue toutefois dans le temps pour revenir à un niveau proche du témoin après 96h.

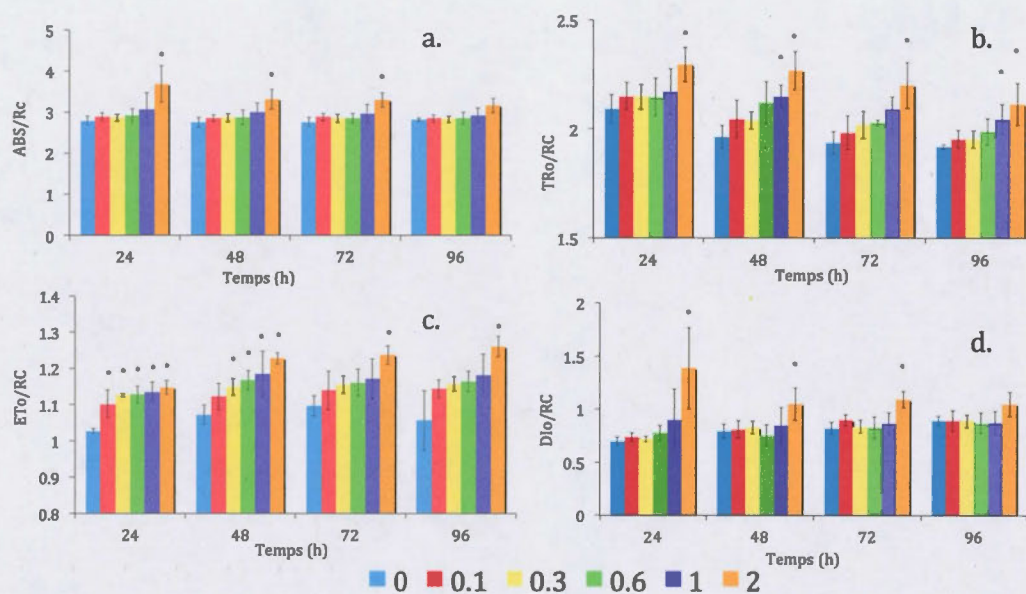


Figure 2.2. : Évolution des variables de fluorescence obtenues par les mesures au PEA pour *Scenedesmus obliquus* exposée à 6 concentrations (en mg.L⁻¹) en Factor 540® a. ABS/RC ; b. TR₀/RC ; c. ET₀/RC et d. DI₀/RC. Un (*) représente une différence significative par rapport au témoin

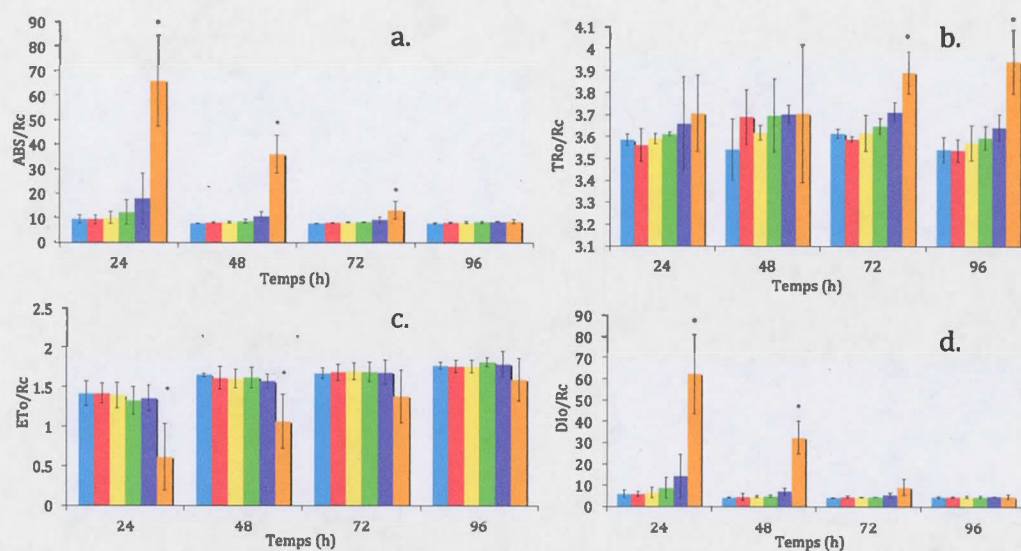


Figure 2.3. : Évolution des vari ■ 0 ■ 0.1 ■ 0.3 ■ 0.6 ■ 1 ■ 2 par PEA pour la souche non-toxique de *Microcystis aeruginosa* exposée à 6 concentrations (en mg.L⁻¹) en Factor 540®.

a. ABS/RC ; b. TR₀/RC ; c. ET₀/RC et d. DI₀/RC. Un (*) représente une différence significative par rapport au témoin

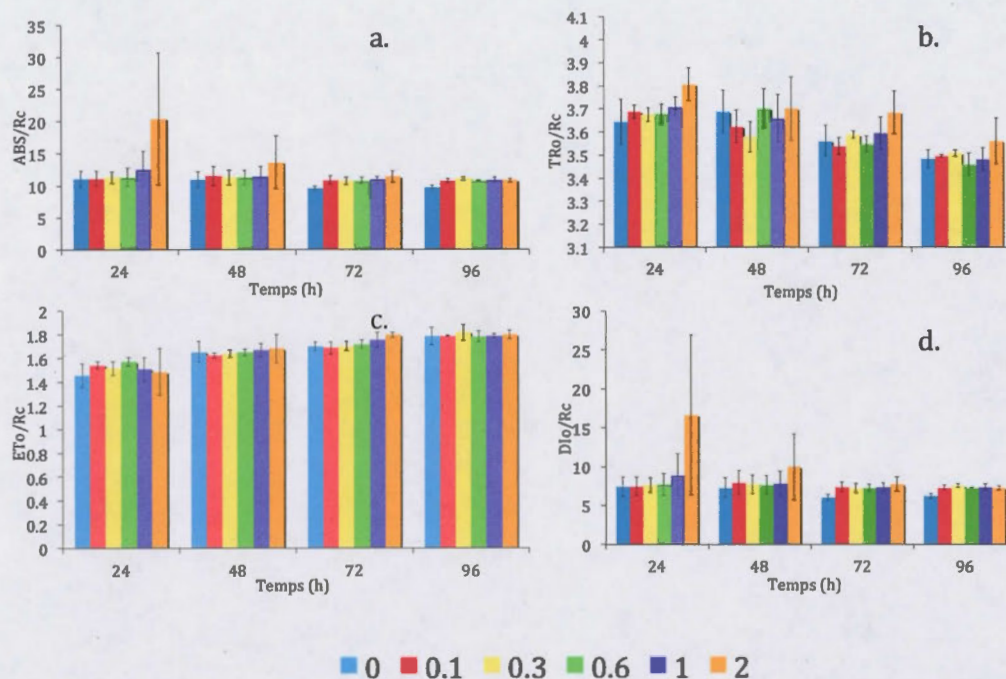


Figure 2.4. : Évolution des variables de fluorescence obtenues par PEA pour la souche toxique de *Microcystis aeruginosa* exposée à 6 concentrations (en mg.L⁻¹) en Factor 540®. a. ABS/Rc ; b. TR₀/Rc ; c. ET₀/Rc et d. DI₀/Rc

2.3.3 Mesure de la fluorescence chlorophyllienne modulée

Dans le cas des algues vertes *S. obliquus*, il a été constaté qu'après 24h, ϕ_M le rendement photochimique maximal du PSII, est affecté en fonction de la dose de Factor 540 reçue (Figure 2.5.). Le ϕ_M est en effet de $0,787 \pm 0,047$ pour l'échantillon témoin alors qu'il n'est que de $0,624 \pm 0,009$ dans le cas d'une contamination au glyphosate de 2 mg.L⁻¹. De même le ϕ'_M , rendement photochimique effectif du photosystème II, montre la même tendance. En effet, après 24h, le témoin présente un ϕ'_M de $0,558 \pm 0,021$ et ce rendement atteint $0,468 \pm 0,062$ lors de la contamination à 2 mg.L⁻¹. Il est alors à noter que la

valeur de ces deux paramètres évolue peu dans le temps en absence de contamination ou à une exposition plus faible à l'herbicide. *A contrario*, les valeurs de ϕ_M et de ϕ'_M dans les échantillons les plus affectés remonte afin de retrouver des valeurs proches de celles observées dans l'échantillon témoin. C'est ainsi qu'après 96h, le ϕ_M est de $0,768 \pm 0,001$ pour le témoin alors qu'il est de $0,738 \pm 0,006$ pour l'échantillon à 2 mg.L^{-1} de glyphosate et le ϕ'_M montre respectivement des valeurs de $0,572 \pm 0,005$ et de $0,569 \pm 0,008$.

De son côté, le NPQ est également affecté après 24h d'exposition aux plus fortes concentrations de glyphosate mais retrouve un niveau proche du témoin après 96h.

Les cyanobactéries *M. aeruginosa* non-toxiques présentent un profil similaire (Figure 2.6.) : le rendement photochimique maximal et effectif sont diminués avec l'augmentation de la dose de glyphosate et quasi-nul après 24h d'exposition à 2 mg.L^{-1} (respectivement $0,028 \pm 0,118$ $0,025 \pm 0,025$). Toutefois, ces deux paramètres retrouvent des valeurs proches du témoin après 96h d'exposition démontrant une activité photosynthétique qui n'est plus affectée. Parallèlement, de manière surprenante, le NPQ présente des évolutions similaires : les échantillons contaminés le plus fortement sont ceux qui présente un NPQ affecté négativement relativement au témoin.

Les cyanobactéries toxiques présentent elles aussi des rendements photochimiques diminués par rapport au témoin (Figure 2.7.) avec des doses en glyphosate croissante après 24h (ϕ_M respectif de $0,270 \pm 0,047$ et $0,399 \pm 0,034$; ϕ'_M respectif de $0,271 \pm 0,113$ et $0,393 \pm 0,020$). Les rendements photosynthétiques sont donc moindrement affectés pour la souche toxique de *M. aeruginosa*. Cette fois, le rendement non-photochimique NPQ ne présente pas d'évolutions claires [glyphosate] / NPQ ou NPQ / Temps.

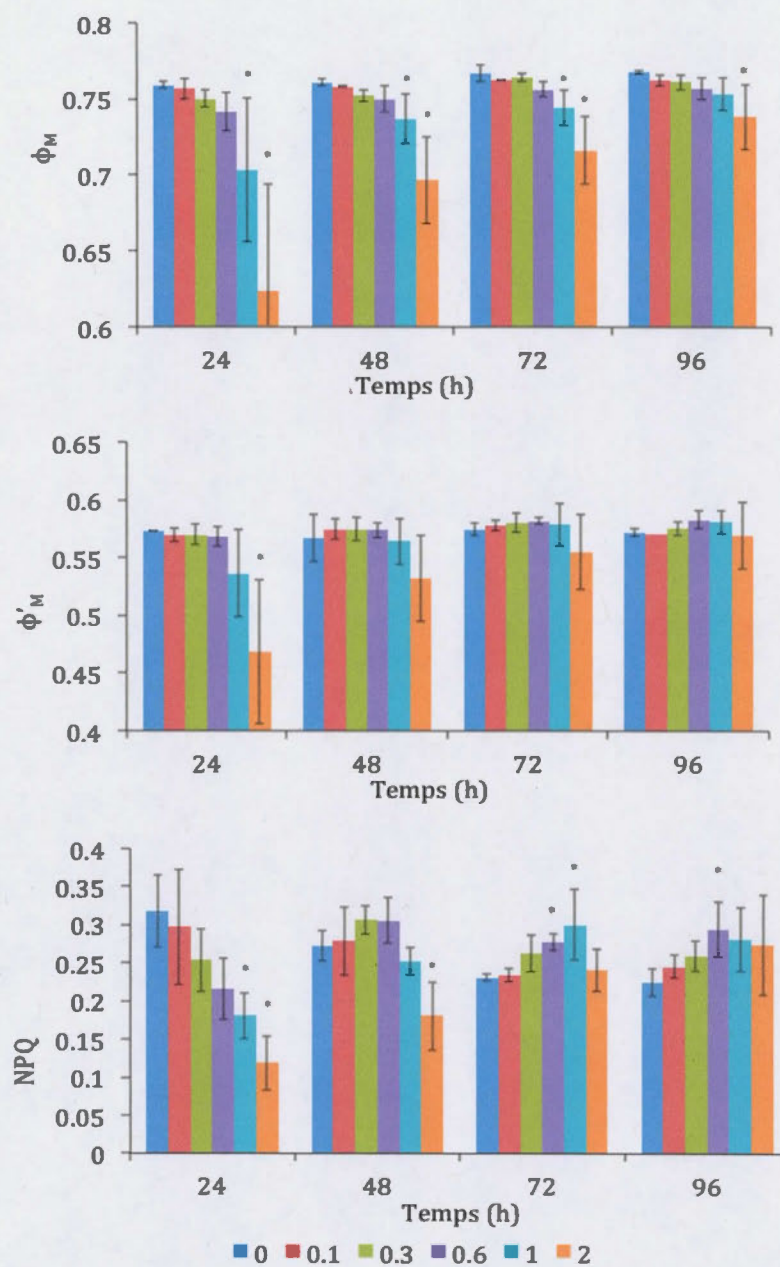


Figure 2.5. : Évolution des rendements photosynthétiques et du quenching non-photochimique chez l'algue verte *Scenedesmus obliquus* en présence de 6 concentrations (mg.L⁻¹) de Factor 540®.

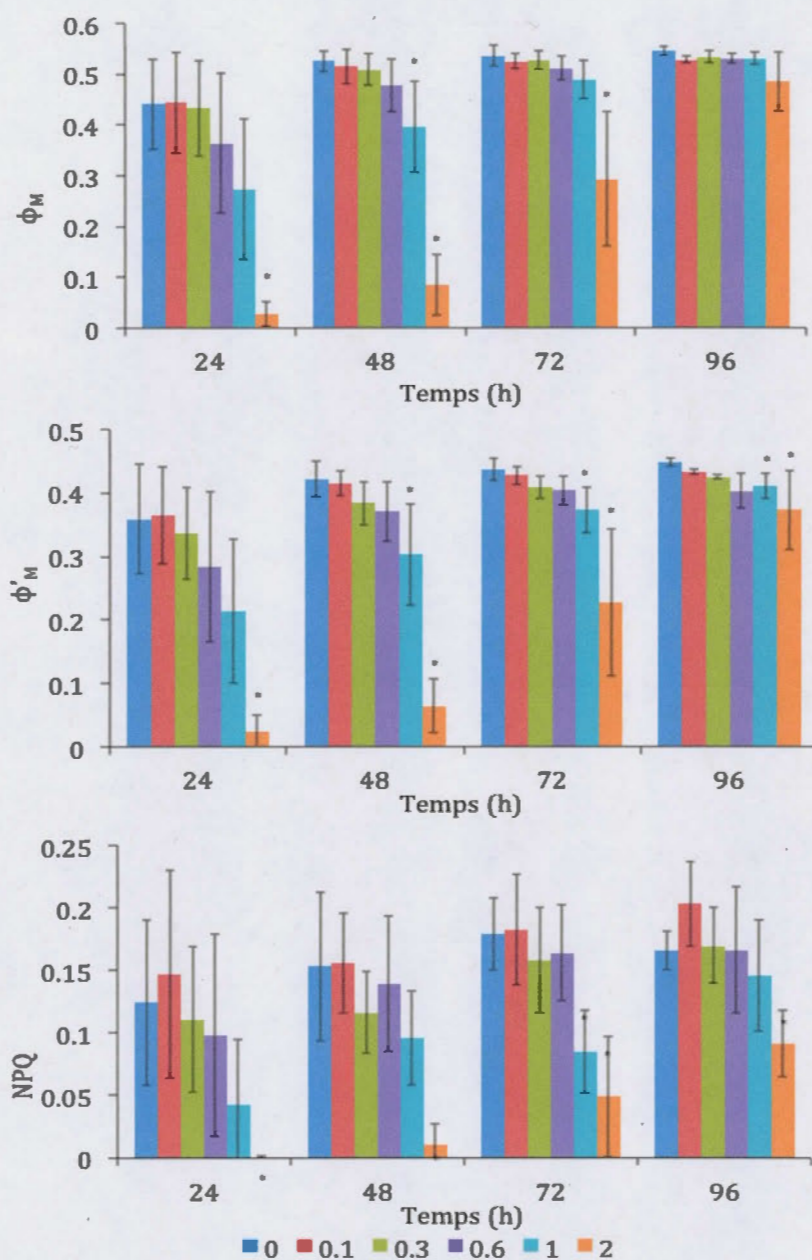


Figure 2.6. : Évolution des rendements photosynthétiques et du quenching non-photochimique chez la souche non-toxique de *Microcystis aeruginosa* en présence de 6 concentrations (mg.L⁻¹) de Factor 540®.

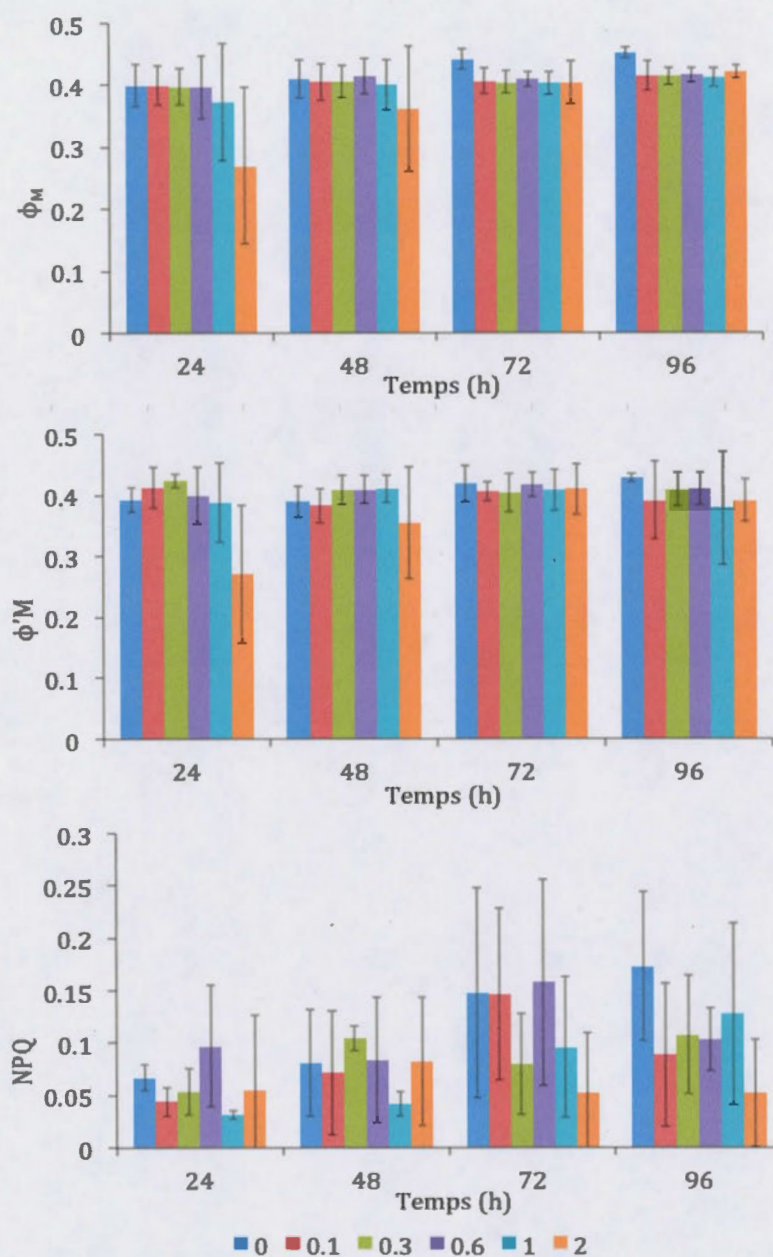


Figure 2.7. : Évolution des rendements photosynthétiques et du quenching non-photochimique chez la souche toxique de *Microcystis aeruginosa* en présence de 6 concentrations (mg.L⁻¹) de Factor 540®.

2.3.4 Mesure des enzymes anti-oxydantes

- *Mesure de la Catalase*

Les écart-types ne permettent pas ou peu de mettre en évidence des différences significatives entre les traitements. Cependant, une présence de glyphosate semble impliquer une augmentation de l'activité de la CAT après 24h pour l'algue verte *S. obliquus* par rapport au témoin (Figure 2.8.), ce qui n'est pas le cas avec les cyanobactéries *M. aeruginosa*, qu'elles soient toxiques ou non. Toutefois, après 96h, l'activité de la CAT a diminué mais ne diffère cependant pas du témoin.

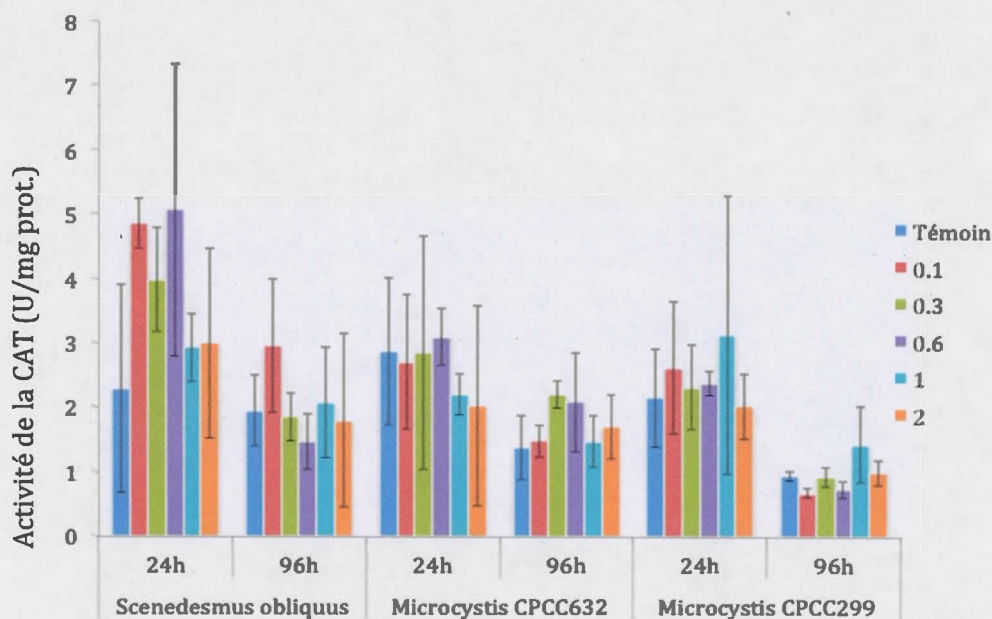


Figure 2.8. : Activité de la CAT (U/mg prot.) chez les trois souches à l'étude à 24h et 96h en fonction de diverses concentrations en glyphosate (mg.L⁻¹)

• Mesure de l'Ascorbate Peroxydase

Après 24h, *S. obliquus* ainsi que la souche non-toxique de *M. aeruginosa* présentent des activités accrues d'APX lors de leur exposition à des concentrations en glyphosate de 1 et 2 mg.L⁻¹ (Figure 2.9.). L'activité de l'APX est significativement réduite après 96h mais reste plus élevée avec l'augmentation des concentrations en glyphosate, particulièrement pour une concentration de 2mg.L⁻¹.

La réaction des cyanobactéries toxiques est différente. En effet, le glyphosate ne provoque pas de différences significatives de l'activité de l'APX. Cependant les activités sont significativement réduites après 96h.

Il est à noter que l'activité de l'APX est globalement plus faible chez les cyanobactéries que chez les algues vertes après 24h et après 96h.

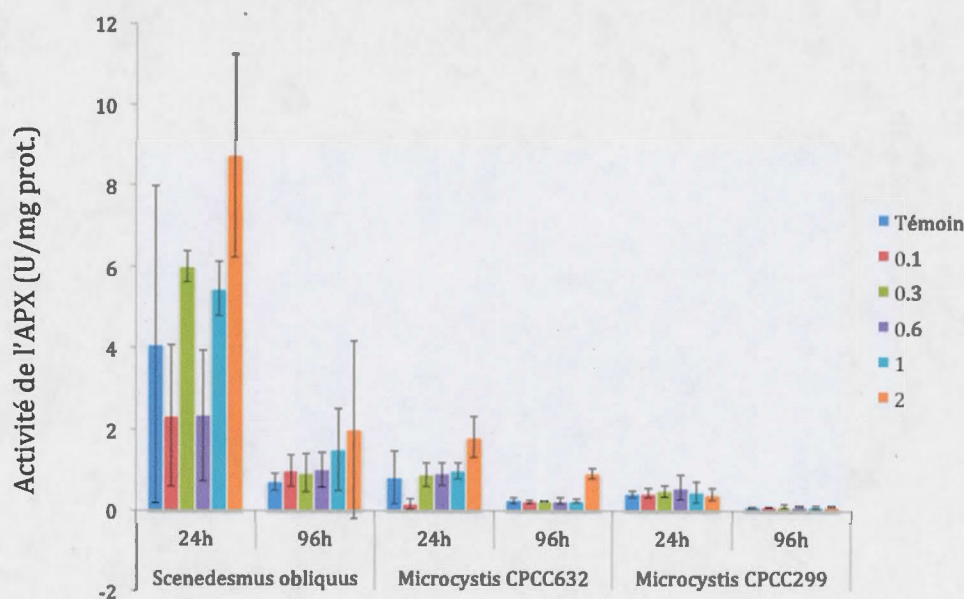


Figure 2.9. : Activité de l'APX (U/mg prot.) chez les trois souches à l'étude à 24h et 96h en fonction de diverses concentrations en glyphosate (mg.L⁻¹)

- *Mesure de la Superoxyde Dismutase*

Le dosage de l'activité de la SOD montre des niveaux très disparates, que ce soit entre traitements aux diverses concentrations en glyphosate qu'entre les espèces de phytoplanctons (figure 2.10.).

Pour *S. obliquus*, une exposition à l'herbicide pendant 24h montre une augmentation de l'activité de la SOD pour des concentrations de 0,1 mg.L⁻¹, 0,3 mg.L⁻¹ et 2 mg.L⁻¹ alors qu'à 0,6 mg.L⁻¹ et 1 mg.L⁻¹, l'activité est semblable au témoin. Après 96h, les niveaux d'activité de la SOD ont significativement diminués et une augmentation de la concentration en glyphosate dans les échantillons semble avoir eu pour effet une augmentation de l'activité de la SOD.

Pour la souche non-toxique de *M. aeruginosa* des doses croissantes de Factor 540 ont eu pour conséquence une augmentation de l'activité de la SOD dès 24h : une exposition à une concentration en glyphosate de 2mg.L⁻¹ engendre une activité 6,8x supérieure au témoin. Cependant après 96h, l'activité de la SOD sont semblables pour 1 et 2 mg.L⁻¹, ont augmenté pour le témoin, 0,1 et 0,3 mg.L⁻¹ alors qu'il a diminué pour 0,6 mg.L⁻¹.

Enfin la souche toxique de *M. aeruginosa* montre une augmentation significative après 24h de l'activité de la SOD pour une exposition à 2 mg.L⁻¹. À 96h, cette tendance est conservée mais avec les activités de l'enzyme amoindries.

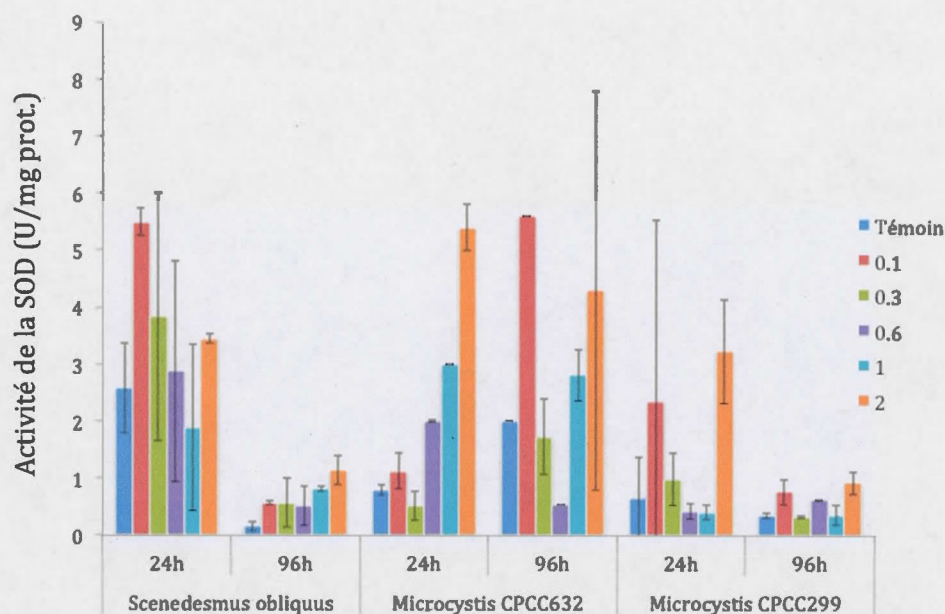


Figure 2.10. : Activité de la SOD (U/mg prot.) chez les trois souches à l'étude à 24h et 96h en fonction de diverses concentrations en glyphosate (mg.L⁻¹)

2.4 Discussion

L'utilisation d'un herbicide comprenant le glyphosate comme agent actif laissait d'ors et déjà présager d'effets sur des organismes non-cibles, c'est-à-dire qui n'étaient pas censés se retrouver un jour exposés à ce genre de produit. Les effets observés ont été multiples : modulation du taux de croissance, perturbation à court terme de l'efficacité photosynthétique et observation d'une réponse antioxydante pour faire face aux dégradations impliquées par l'herbicide.

Tout d'abord, une présence accrue en glyphosate dans les échantillons étudiés lors de ces travaux montrent une diminution significative de la concentrations en phytoplancton pour des expositions à des teneurs en herbicide de 2 mg.L⁻¹

voire 0,6 et 1 mg.L⁻¹ pour des expositions à moyens termes (de 48h à 96h). L'algue verte et les deux souches de cyanobactéries utilisées dans ces travaux voient leur croissance affectée au même titre que d'autres algues vertes dès 1,56 mg.L⁻¹ (Vendrell *et al.*, 2009 ; Wong, 2000) ou des cyanobactéries (Hutber *et al.*, 1979). La position du phytoplancton à la base de la chaîne trophique laisse donc présager de potentiels impacts sur l'ensemble de celle-ci, tels que décrit par Relyea (2005). Au Québec, des concentrations en glyphosate dans le milieu naturel pouvant atteindre 2,8mg.L⁻¹ ont été observées (Couture *et al.*, 1995 ; Legris et Couture, 1989). Ces concentrations diminuent rapidement du fait du piégeage dans les sédiments mais cela n'en fait pas pour autant un risque réduit. En effet, à court terme, une potentielle remise en suspension des sédiments pourrait entraîner des teneurs bien supérieures. À plus long terme, la dégradation par les bactéries rend ces sédiments moins nocifs.

- *Activité photosynthétique*

L'augmentation après 24h du ratio ABS/RC indique pour les trois espèces retenues un effet sur la quantité d'énergie lumineuse absorbée par les antennes collectrices de lumière (LHCII) (Force, Critchley et Van Rensen, 2003). De prime abord, les résultats semblent montrer une augmentation de la taille des antennes qui se traduit alors par une efficacité accrue de la captation de lumière par les LHCII. Toutefois, cette efficacité est associée à la quantité de CR opérationnels. Les travaux de Strasser, Srivastava et Tsimilli-Michael (2000) montrent que cette augmentation peut être associée à l'inactivation de ces centres réactionnels. D'abord significatif en présence de concentrations élevées en glyphosate (1 et 2 mg.L⁻¹), cet impact tend à diminuer dans le temps jusqu'à être annihiler après 96h d'exposition chez les cyanobactéries.

Cette inactivation des CR est confirmée par l'augmentation en parallèle des TR_0/RC et DI_0/RC traduisant ainsi respectivement un effet, par centre réactionnel, sur la quantité d'énergie lumineuse attribuée à la séparation de charge du P680 et la proportion de l'énergie lumineuse dissipée sous forme de chaleur.

Toutefois, dans ce dernier cas, la seule diminution des CR ne semble pas pouvoir expliquer une augmentation des DI_0/RC chez la souche non-toxique de *M. aeruginosa* et dans une moindre mesure chez son homologue toxique. Respectivement les diminutions ou l'absence d'augmentation de ET_0/RC montrent que parallèlement à la diminution des quantités de CR décrite précédemment, l'énergie apportée au P680 ne dépasse pas la quinone *a*. Il y a donc une perte d'énergie en amont de cet accepteur d'électron mais en aval des CR qui explique en partie l'augmentation des DI_0/RC (dissipation de l'énergie sous forme de chaleur) observée. Cette tendance n'est *a contrario* pas exprimée chez l'algue verte *Scenedesmus obliquus*: l'énergie évacuée sous forme de chaleur serait donc issue en majeure partie d'une diminution de nombre de CR et peu ou pas d'un dysfonctionnement d'un ou plusieurs accepteurs d'électron au niveau du P680.

Les paramètres obtenus par la mesure de fluorescence au PAM viennent appuyer ceux obtenus par les mesures de cinétique rapide de photosynthèse obtenues au PEA.

Les rendements photosynthétiques maximal et effectif du PSII, ϕ_M et ϕ'_M montrent que la cyanobactérie *M. aeruginosa* non-toxique CPCC632 est la plus fortement affectée par une contamination à 2 mg.L⁻¹. En effet, après 24h, ces deux paramètres sont quasiment annihilés. Un fort effet inhibiteur de l'efficacité photosynthétique est également observé pour la souche CPCC299 et dans une moindre mesure pour l'algue *S. obliquus*.

Après 96h d'exposition, ces trois espèces retrouvent des efficacités photosynthétiques similaires aux témoins non-exposés au Factor 540®. Deux raisons peuvent alors être invoquées dans ce processus de récupération : la dégradation de l'herbicide et/ou la mise en place de processus de défense et de réparation efficace par le phytoplancton. Dans le premier cas, Santé Canada (1987) annonce une demi-vie du glyphosate inférieure à 24h dans les milieux aquatiques, car il subit une décomposition microbienne rapide; toutefois, les travaux présentés ici ont été réalisées en conditions stériles et permettent donc d'écarter certainement cette hypothèse. Cependant une autre hypothèse avancée serait liée à la photodécomposition. La demi vie du glyphosate est de l'ordre de 20 à 100 jours dans les sols, l'exposant ainsi à un potentiel phénomène de lixiviation qui le conduirait dans les milieux aquatiques naturels.. Ce point pourrait expliquer en partie qu'il reste une toxicité encore suffisamment élevée après 24h, mais que sa persistance soit trop faible au delà pour continuer d'agir sur le phytoplancton.

Le second point évoqué ayant trait aux défenses des cellules photosynthétiques met en avant le fait que le glyphosate pourrait interférer dans la chaîne de transfert d'électron de la photosynthèse et limiter sa capacité à assimiler les électrons issus de la séparation de charge. Comme décrit précédemment, la voie préférentielle d'évacuation de l'énergie excédentaire est alors la dissipation par chaleur essentiellement traduite par la mesure du quenching non-photochimique NPQ. Or, ce n'est pas ce qui est observé dans les résultats obtenus ici. En effet, les valeurs de NPQ faibles, correspondant à une faible dissipation de l'énergie excédentaire sous forme de chaleur sont observées lorsque l'efficacité photosynthétique est réduite. L'énergie n'est alors pas évacuée par cette voie. Chez les cyanobactéries (car ce sont les plus sensibles ici), Gorbunov et ses collaborateurs (2011) ont démontré qu'une protéine dite OCP (pour Orange Carotenoid Protein) était l'inductrice du NPQ. Une hypothèse

avancée serait alors que le Factor 540® pourrait avoir un impact sur cette protéine et ainsi empêcher une augmentation du quenching non-photochimique. Toutefois, les algues vertes ne possèdent pas ces protéines, mais ce sont tout de même des caroténoïdes qui sont en charge de la photoprotection et il a été démontré que le glyphosate provoque une diminution de la quantité en caroténoïdes par l'inhibition de la biosynthèse de celles-ci (Dewick, 1998 ; Hernando *et al.*, 1989)

Avec des réactions photochimiques diminuées et un système compensatoire d'évacuation de l'énergie excédentaire lui aussi affecté, une augmentation des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (provoquant des dégradations des acides aminées notamment) est envisagée. Pour s'en défendre, les cellules phytoplanctoniques doivent produire des enzymes antioxydantes qui prennent en charge ces EROs pour les neutraliser.

- *La réponse antioxydante.*

La prise en charge de l'énergie excédante par les atomes d'oxygène (formant des espèces réactives de l'oxygène) et leur réduction par les enzymes antioxydantes semble être alors primordiale pour éviter les dommages aux cellules phytoplanctoniques.

D'une manière générale, que ce soit pour l'algue verte *S. obliquus* ou les deux souches de cyanobactéries *M. aeruginosa*, les enzymes anti-oxydantes présentent des activités moindres après 96h comparativement à celles observées après 24h d'exposition au Factor 540®. Un scénario peut alors être proposé : l'herbicide induit une réponse enzymatique antioxydante rapide des cellules phytoplanctoniques ; cette défense s'avère fructueuse et l'activité des enzymes diminue à mesure que le milieu s'appauvrit en Factor 540®. Toutefois, il est difficile d'entériner une telle hypothèse du fait de la grande variabilité

entre les réplicats et entre les différents niveaux de contaminations observés : par exemple, les activités enzymatiques sont aussi supérieures à 24h pour le témoin. Les cultures ayant été préalablement adaptées aux conditions de cultures pendant trois mois, il serait nécessaire d'effectuer des analyses complémentaires pour expliquer cette observation.

Une autre hypothèse consiste à présumer l'opposé : les enzymes antioxydantes ne sont pas produites en concentrations suffisantes et par conséquent présentent une activité globale réduite. Conjointement, si les ERO ne sont pas neutralisés efficacement, ces derniers pourraient alors à l'inverse soit dégrader directement les enzymes antioxydantes soit causer des dommages à l'ADN empêchant *in fine* la production efficace d'enzymes antioxydantes. Cette dernière hypothèse est appuyée par le fait que le glyphosate est connu pour sa nocivité envers l'ADN (Koller *et al.*, 2012).

Cependant, à l'exception de la souche toxique de cyanobactérie, la tendance observée pour les activités en SOD ou plus clairement avec l'APX augmente à mesure que la concentration en glyphosate augmente elle aussi. Ce constat est en accord avec les observations effectuées de rendements photosynthétiques. En effet, particulièrement après 24h, les ϕ_M et ϕ'_M étaient fortement affectés pour des concentrations de 2 mg.L⁻¹, dénotant alors un effet sur l'appareil photosynthétique et une perte d'énergie. Cette dernière n'a pas été traduite par une augmentation du NPQ, c'est-à-dire par une perte de chaleur. Les tendances observées semblent aller vers l'hypothèse formulée plus tôt : l'énergie excédentaire n'étant pas prise en charge par une chaîne photosynthétique défectueuse engendre la formation d'ERO.

Alors que le glyphosate est un herbicide, il est surprenant de constater qu'une large majorité des études effectuées le concernant est orientée sur la toxicité envers les animaux plutôt que les autres organismes photosynthétiques non-cibles (Annett *et al.*, 2014). Toutefois Romero et ses collaborateurs (2011) ont

démontrés qu'une souche résistante au glyphosate de l'algue verte *Chlorella kessleri* réagissait malgré tout à de fortes concentrations de l'herbicide, notamment par une activité accrue de SOD et de CAT. Ce constat est posé pour des doses nettement supérieures à celles utilisées dans la présente étude (jusqu'à 70 mg.L⁻¹) mais permet de mettre en évidence et d'exacerber les réactions enzymatiques de cette algue verte et d'appuyer les tendances observées dans nos travaux.

D'autre part, dans d'autres organismes photosynthétiques cibles tels que le riz (Ahsan *et al.*, 2008), il a également été démontré qu'une exposition au glyphosate engendrée un stress oxydatif.

D'autres études mettent en évidence la sensibilité d'une autre enzyme antioxydante permettant l'investigation d'un stress oxydatif : l'activité de la glutathion-s-transférase (Jain et Bhalla-Sarin, 2001 ; Uotila *et al.*, 1995). Dans les expériences présentées, il semble que l'APX soit également un bon outil : la mesure est rapide et requiert peu de manipulation réduisant par la même la variabilité, et les résultats montrent en effet une bonne répétabilité et la mise en évidence d'une production accrue d'enzyme dès 2 mg.L⁻¹.

2.5 Conclusion

Les expériences réalisées dans ce chapitre montrent des réactions en chaîne. Les analyses montrent en effet une réduction du nombre de centres réactionnels et laisse présumer une augmentation de la taille des antennes collectrices de lumière. Toutefois, chez les cyanobactéries, l'interférence du glyphosate semble d'avantage se traduire dans la chaîne de transport d'électrons entre les centres réactionnels et la quinone A.

Malgré la diminution des rendements photosynthétiques, aucun dégagement notable d'énergie sous forme de chaleur n'est à constater. Les électrons

excédentaires ne pouvant être pris en charge par la chaîne photosynthétique engendre la création d'ERO, traduit par des réponses enzymatiques antioxydantes.

Bien que la même espèce de cyanobactérie ait été utilisée, l'une toxique, l'autre non, les souches sont différentes. Il est probable que les différences de réponses observées en terme de rendements photosynthétiques et de réponses antioxydantes soient attribuables à un métabolisme différent d'une souche à l'autre.

Toutefois, l'utilisation de technique de mesure telle que la chromatographie haute performance en phase liquide (HPLC) permettrait de mettre en relief l'activité enzymatique antioxydante par une quantification des enzymes antioxydantes. De plus l'utilisation d'une telle méthode permettrait aussi de quantifier les pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) et permettrait une meilleure mise en relief des premiers constats présentés ici.

Chapitre III

THE INFLUENCE OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA* ON *DAPHNIA MAGNA* FOOD ELECTIVITY AND GUT TRANSIT TIME

Thibault Chesney¹, Akash R. Sastri^{1,2}, Beatrix E. Beisner², S. Nandini³, S.S.S. Sarma³, Philippe Juneau^{1*}

¹Université du Québec à Montréal, Department of Biological Sciences-TOXEN, Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms Laboratory, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, H3C 3P8, Quebec, Canada

²Université du Québec à Montréal, Department of Biological Sciences and GRIL, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, H3C 3P8, Quebec, Canada

³National Autonomous University of Mexico, Campus Iztacala, Av. de los Barrios no. 1, Tlalnepantla, State of Mexico, Mexico

Akash Sastri current address: Ocean Networks Canada, University of Victoria, Victoria, V8W 2Y2, British Columbia, Canada

* Corresponding author: juneau.philippe@uqam.ca, Université du Québec à Montréal, Department of Biological Sciences-TOXEN, Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms Laboratory C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal (Quebec), H3C 3P8, Canada, Tel.: 514-987-3000 #3988, Fax: 514-987-4647

3.1 Résumé

Le zooplankton se nourrit de diverses sources de phytoplanctons, variables dans l'espace et dans le temps. Les différents groupes de phytoplancton représentent différentes qualités nutritives pour les cladocères du genre *Daphnia* d'un point de vue stochiométrique, mais aussi principalement à cause des différences de digestibilité. La fluorescence chlorophyllienne a été utilisée pour mesurer directement la quantité et la composition du phytoplancton (algues vertes et cyanobactéries) dans les intestins de *Daphnia magna* vivantes and ainsi estimer directement des différences de temps de transit intestinal (GTT pour Gut Transit Time). Dans notre étude de laboratoire, il a été observé une diminution du GTT en présence d'une nourriture de moindre qualité, relativement à une diète plus bénéfique composée exclusivement de l'algue verte : *S. obliquus* (GTT = 27 min 20 s). En mélange, des diètes de moindre qualité composée de 75 % de cyanobactéries *Microcystis aeruginosa* et de 25% de *S. obliquus* ont monté un GTT plus rapide, de même que les diètes composées exclusivement de cyanobactéries non-toxiques (GTT = 19 min 42 s). Le GTT n'a pas pu être estimé lorsque les diètes étaient composées exclusivement de *M. aeruginosa* toxique dû à une ingestion insignifiante de cyanobactéries. Par l'utilisation de l'indice d'Électivité d'Ivlev, nous avons démontré qu'en présence d'un mélange de phytoplancton, *D. magna* était capable d'éviter l'ingestion de la fraction de moindre qualité (les cyanobactéries) en faveur de la fraction plus bénéfique (les algues vertes). Toutefois, cette capacité semble perdue ou amoindrie lorsque la diète est composée principalement de cyanobactéries.

Mots-clefs : cyanobactérie, cladocère, électivité, algue verte, temps de transit intestinal

3.2 Abstract

Cladocerans feed on a variety of phytoplankton food sources, which are variable across space and time. Different phytoplankton groups represent different nutritional quality to *Daphnia* due to differences in their stoichiometry or digestibility. We used chlorophyll fluorescence to directly measure phytoplankton group quantity and composition (greens, diatoms and cyanobacteria) in the guts of live *Daphnia magna* and thereby directly assessed differences in Gut Transit Time (GTT). In our laboratory study, we observed a decrease of GTT with lower food quality relative to the most suitable diet treatment composed only of the green alga: *Scenedesmus obliquus* (GTT = 27 min 20 s). Mixed, lower quality diets composed of 75% cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa* and 25% *S. obliquus* resulted in faster GTT, as did diets exclusively composed of microcystin-lacking cyanobacteria (GTT = 19 min 42 s). The GTT was not even assessable when diets were composed exclusively of microcystin-producing *M. aeruginosa* due to insignificant ingestion of the cyanobacteria. Using Ivlev's Electivity index, we demonstrate that provided with mixed algal food, *D. magna* was able to avoid ingesting lower quality food (cyanobacteria) in favor of more valuable material (green alga). However, this ability seems lost or at least decreased when exposed to food mixtures dominated by cyanobacteria.

Key words: cyanoabacteria, cladoceran, electivity, green algae, gut transit time

3.3 Introduction

The increasing prevalence of cyanobacterial blooms is a global concern because this group of autotrophs often out-competes algal groups (i.e. diatoms and green algae) for light and nutrients (Shapiro 1973, Richardson et al. 1983). Moreover, cyanobacterial blooms can be potentially harmful to grazers as many strains produce toxins. The relative concentration and types of cyanobacterial toxins elicit different effects on zooplankton: laboratory studies have considered the potential negative influence of the microcystin-producing (MC-producing) cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa*, on ingestion rates (Rohrlack, 1999), survivorship (Ferraio-Filho et al. 2000), somatic and population growth (Alva-Martínez et al. 2004, Lürling 2003a, 2003b). However, toxicity alone may not be the sole factor explaining negative life history responses as pure microcystins isolated from *Microcystis* do not affect *Daphnia* at natural cyanobacterial densities (DeMott et al. 1991, Lürling and van der Grinten 2003, Chen et al. 2013). Gulati and DeMott (1997) also notes that cyanobacterial characteristics such as: (a) size and shape of cells/colonies, (b) morphological responses/defenses against grazers (Rohrlack et al. 1999) and (c) their poor nutritional value influence whether or not zooplankton consume phytoplankton (Wilson et al., 2006).

Feeding and ingestion are the significant measures for assessing the strength of the trophic link between phytoplankton and zooplankton. Both these variables are dependent on the size and morphology of individual cells. For example, the size of the phytoplankton cells ingested, or whether or not cells form colonies or filaments can influence ingestion rates. The size of the zooplankton grazer itself also has a direct influence on the potential size range of particles ingested (Peters and Downing 1984, Hansen et al. 1994, Rohrlack et al. 2001). However, for laboratory tests involving single cladocerans species, this factor is not important.

Rohrlack et al. (1999) demonstrate that MC-producing cyanobacterial strains can exert a strong inhibitory effect on feeding. However, in the same work, three cyanotoxin-producing wild strains when tested, led to different and contradictory conclusions in terms of ingestion rates. Using simple laboratory techniques (e.g. haemocytometer counting), it is possible to assess the ability of some cladoceran species to differentiate toxin-producing cyanobacteria from green algae of comparable cell size (Pérez-Morales et al. 2014); however, such tools often fail when the toxin-producing vs. toxin-lacking strains of a given cyanobacterium are included in the diet. Finally, some studies have shown that cladocerans develop some degree of tolerance to toxin-producing cyanobacteria after a few generations (Guo and Xie 2006) or when exposed over a long period of time to cyanobacteria (Sarnelle and Wilson, 2005). Thus, these complex and in some cases even contradictory results call for more detailed studies of the specific feeding responses (i.e. prey selection, filtering efficiency, ingestion and gut transit times, digestibility and assimilation efficiency) of daphniids with respect to differentially toxic and morphologically structured algal food sources, and to different cladocerans growth stages (young or adult).

The quantity of food particles ingested by zooplankton can be determined by different methods including hemocytometer counting, automatic particle counters, radio tracer, direct microscopic observation of zooplankton gut (Downing and Rigler, 1984). The *in vivo* measurement of the fluorescence of ingested material in the zooplankton intestines is yet another method. Previous works (Coelho et al. 2009, Sastri et al. 2011) have shown that the measurement of gut fluorescence of living animals using a Phyto-PAM fluorometer was simple, rapid, quantitative and effective. The Phyto-PAM offers the possibility to discriminate between groups of phytoplankton (green algae, cyanobacteria and brown algae) through assessment of both the food offered and that ingested by daphniids, based on differences in their fluorescence. The Phyto-PAM here was

used to assess the ability of *D. magna* to discriminate between major phytoplankton groups.

Thus, the main objective of this study was to assess how variation in the intestinal transit time of ingested food for *Daphnia magna* was influenced by the relative biomass of cyanobacteria in the medium and whether or not toxicity is important. We also tested whether or not *D. magna* was able to discriminate its food source in a diet composed of cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa* and a green alga, *Scenedesmus obliquus*. Our experiments also sought to assess how gut transit time (GTT; i.e. the rate at which ingested material passes through *D. magna* intestine) was influenced by the presence and relative availability of both MC-producing and microcystin-lacking strains of *Microcystis aeruginosa* as well as the green alga, *Scenedesmus obliquus*.

3.4 Methods

In general, our experiments sought to assess how gut transit time (GTT; i.e. the rate at which ingested material passes through *D. magna* intestine) was influenced by the presence and relative availability of both toxic and non-toxic strains of *Microcystis aeruginosa* as well as the green alga, *Scenedesmus obliquus*.

3.4.1 Phytoplankton

The two phytoplankton species used in our feeding experiments were: the green alga *Scenedesmus obliquus* (*S. obliquus*) and the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*). Cultures of both species were initiated with inoculum originating from the Canadian Phycological Culture Center (CPCC,

Waterloo). We used two strains of *M. aeruginosa*: a microcystin-lacking strain (CPCC 632), and a MC-producing strain (CPCC 299). All three phytoplankton cultures were grown in COMBO growth media with a pH = 7.4 (Kilham et al. 1998) because it is non-toxic to zooplankton. Phytoplankton cultures were grown in order to minimize contamination in 250mL Erlenmeyer flasks at 23°C at 85 $\mu\text{mol.photon}^{-1}.\text{m}^{-2}$ light intensity with 12:12 hours of light and dark.

With respect to our experiments, several studies concerned with cladoceran feeding behavior have used *S. obliquus* as a control and *M. aeruginosa* (non-colonial strains) as a treatment (Rohrlack et al. 1999, Lürting 2003a). Neither of the MC-lacking or MC-producing strains of *M. aeruginosa* strains that we used has been observed to form colonies (P. Juneau *personal observation*). We do not consider the influence of cell-size further since cells in our strains of *S. obliquus* and *M. aeruginosa* were of a similar size, being 6 and 4 μm equivalent spherical diameter (ESD), respectively.

3.4.2 Zooplankton

The zooplankton species used for our experiments was the cladoceran *Daphnia magna*, obtained from the St-Lawrence Centre, Environment Canada in Montreal. This species represents a model for ecological and ecotoxicological studies (Sarma and Nandini, 2006). Prior to the experiment, *D. magna* cultures were maintained in the laboratory in Environment Protection Agency medium (Weber 1993), in a 20L aquarium at 21°C, under 12:12 light: dark cycle and fed *S. obliquus ad libitum* with food replenished on a daily basis. Culture medium was renewed by 50% on a weekly basis. All animals used in this study originated from a single individual in the initial culture. *D. magna* with the same body length were used in the experiments. Length of individuals was measured at the

distance between the top of the head and base of the tail spine using a dissecting microscope (30x) and a calibrated ocular micrometer.

Regardless of diet type, we found no relationship between GTT and *Daphnia* body length (*Scenedesmus* $P = 0.20$; *Microcystis* $P = 0.56$) for the animal size range considered (see further, Fig. 3.2). Given this lack of body-size dependence for GTT we decided to use larger individuals, which had a greater potential to ingest higher quantities of food thereby possibly elevating our ability to detect the fluorescence signal (Sastri *et al.* 2011).

3.4.3 Fluorescence measurements and experimental treatments

Here we relied on *in vivo* measurements of the fluorescence of ingested material in *D. magna* intestine. We measured gut fluorescence of living animals using a Phyto-PAM fluorometer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) following Coelho *et al.* (2009) and Sastri *et al.* (2011). Specifically, the measuring light was maintained at the same intensity ($48 \mu\text{mol.photon}^{-1}.\text{m}^{-2}$) across all experiments (an equivalent measuring frequency of 32). Reference spectra were determined at this measuring light intensity for each phytoplankton group used in this study. Then the Phyto-PAM was calibrated according to the user manual (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany).

Our experiments followed the design of Alva-Martínez *et al.* (2004). Briefly, prior to feeding experiments, 3 individual *D. magna* were transferred to a single well of a 6-well plate ($\sim 8 \text{ mL}$) containing clean USEPA medium and allowed to clear their gut contents for 12h. Then 50 to 75% of the media was removed, being replaced with varying proportions of either *S. obliquus* or *M. aeruginosa* (either the MC-lacking or MC-producing strain) in COMBO, but with a constant total cell concentration of $5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$. Daphniids were then exposed for 12h to each of the following diets: 100% *S. obliquus* (So), 75% So and 25% *M. aeruginosa*

(Ma), 50% So and 50% Ma, 25% So and 75% Ma or 100% Ma. Following the 12-hour diet exposure, animals were rinsed in three successive transfers through fresh EPA medium. *D. magna* were then transferred to a 3.5 mL-capacity measuring cuvette containing clean EPA medium and *in vivo* gut fluorescence (F_{0-A} in equation 1) was measured with three successive (rapid) measurements using the Phyto-PAM. These measurement sets were repeated every 5 min for a total of 40 min. Between each set of measurements, *Daphnia* were transferred to a new well containing fresh medium. The fluorescence of the medium (at each interval) was also measured at each time-step to estimate background fluorescence (F_{0-B} in equation 1). This procedure was repeated 3 times per diet ($n=3$, therefore an average of 9 *Daphnia*).

Gut F_0 at time = t was calculated as:

$$\text{Gut } F_0 = F_{0-A} - F_{0-B} \quad (1),$$

The natural logarithm of Gut F_0 was plotted and regressed against time (minutes) (example presented in Fig. 3.1). The slope of this regression (a) was then used to calculate the gut transit time (GTT) for the sample as:

$$\text{GTT} = -1 / a \quad (2)$$

3.4.4 Assessment of food discrimination ability of *Daphnia*

To assess electivity, the relative proportions of green algae and cyanobacteria detected in the gut were compared to the relative proportion of these phytoplankton species in the diet offered by calculating Ivlev's Electivity Index (E) (1961):

$$E = (r_i - p_i) / (r_i + p_i) \quad (3),$$

where r_i is the relative abundance of the focal food in the medium for which preference is tested and p_i the relative abundance in the *D. magna* gut. E values vary between -1 and 1, reflecting an ability to exclusively ingest or reject a type of food, and a value of 0 indicates non-electivity.

3.4.5 Statistical analyses

Statistical analyses were carried out with Prism 5 (GraphPad Software Inc.). After testing for normality, the significance of any differences between diet treatments was tested with analysis of variance (ANOVA). Since GTT measurements for mixed diets were measured in triplicate, we used the non-parametric Kruskal-Wallis test to assess significant differences with adjustments to the alpha cut-offs for significance adjusted using a Bonferroni multiple comparison test. Differences in E within the mixed diet treatments were treated individually with a t -test.

3.5 Results

The GTT for *D. magna* fed an exclusive diet of *S. obliquus* was 27 min 20 s, while those fed only the MC-lacking cyanobacteria *M. aeruginosa* had a significantly shorter GTT of 19 min 42 s (t -test, $P = 0.016$; Table 3.2). Very low gut fluorescence levels were measured when *D. magna* was fed MC-producing strain of *M. aeruginosa* (CPCC 299). Thus, it was assumed that under these conditions, *D. magna* did not ingest enough food to obtain meaningful GTT values with the Phyto-PAM. Calculated GTT values were extreme and varied between negative (-120 minutes) and excessively prolonged (106 minutes). GTT was at least in part, dependent on the diet given to *D. magna* (Fig. 3.3; Table 3.1). GTT did not vary significantly for diets ranging from 100% *Scenedesmus* to a 1:1 diet of

Scenedesmus and MC-lacking *Microcystis* (CPCC632) (Fig. 3.3). For diets dominated by cyanobacteria, GTT was significantly faster ($P = 0.020$) than when diets were mainly composed of green algae (*S. obliquus*), especially when the MC-producing strain CPCC299 was present ($P = 0.002$) (Table 3.1).

Variation in ingestion rates was addressed by considering both the quantity of food in the gut and the nature of food offered to daphniids. Among the treatments, the concentration of chlorophyll *a* (representing total biomass of both *S. obliquus* and *M. aeruginosa*) in the gut did not vary significantly ($9.90 \mu\text{g L}^{-1} \pm 5.56 \text{ SD}$, Bonferroni Multiple Comparison test: $P > 0.05$). Despite this statistical conclusion, we were able to record that chlorophyll concentration was $1.76 \mu\text{g L}^{-1} \pm 0.42 \text{ SD}$ when daphniids were fed exclusively with MC-producing *Microcystis* only, while it was $9.34 \mu\text{g L}^{-1} \pm 5.05 \text{ SD}$ when fed *Scenedesmus* and $5.03 \mu\text{g L}^{-1} \pm 0.87 \text{ SD}$ when fed MC-lacking *Microcystis*.

The Phyto-PAM data allowed us to discriminate between green algae and cyanobacteria biomass to investigate the proportion of each food type ingested relative to the food combinations offered in the media in each treatment (Fig. 3.4).

However, interpretation of the raw data became complicated since a signal corresponding to green algae was measured even though animals were offered a 100% *M. aeruginosa* diet. Additional analyses revealed that this "green" signal was related to phytoplankton cell degradation products in the gut. Using algal cultures exposed to the same conditions as those of our GTT experiments, we found that by simulating conditions in the intestine of *D. magna*, (acidification to a pH of 5), a proportion of the *M. aeruginosa* fluorescence signal was measured as "green" on the PhytoPAM. Thus, assuming that any green signal measured in the intestines for animals fed an exclusive *M. aeruginosa* diet was a result of pigment degradation in the gut, we considered the entire signal to be "blue" (i.e. cyanobacteria). The green fluorescence signal under these conditions could then

be used to correct the values for the cyanobacterial fluorescence signal in the other treatments. This correction was based on the proportion of "green" relative to "blue" signal in the gut of animals fed 100% cyanobacteria (Fig. 4). In this case, the blue signal had to be multiplied by 2.11 for diets containing MC-lacking *Microcystis* and by 3.11 for diets with MC-producing cyanobacteria. The evaluated quantity related to blue signal was then removed from the green signal.

After correcting for pigment degradation (Fig. 3.4.), we found that there were no differences in the Ivlev electivity for *M. aeruginosa* of *D. magna* offered either MC-producing or MC-lacking strain (i.e. the ratio of cyanobacteria relative to green algae in the gut was not dependent on toxicity) (Table 3.2.). *E* for *S. obliquus* was significantly different from zero demonstrating that *D. magna* preferentially consumed green algae when presented mixed with cyanobacteria. *E* calculated when the diet was composed of 75% *Microcystis* (either MC-producing and MC-lacking) were statistically different from those *E*-values obtained when daphniids were fed by 25 or 50% *Microcystis* (Table 3.2). Moreover, *E* was closer to 0 as the proportion of *Microcystis* in the food increased.

3.6 Discussion

The major objective of this study (to assess the effect of MC-producing and MC-lacking strains *M. aeruginosa* on the gut transit time (GTT) of *D. magna*) was achieved by employing the Phyto-PAM. The experimental approach also permitted us to assess the variation of the feeding behavior (electivity) of *D. magna* when exposed to diets consisting of variable proportions of *M. aeruginosa*. Overall, we found that GTT was variable and dependent on the relative proportion of *M. aeruginosa* in the diet. We also demonstrated that *D.*

magna was selective in its feeding, choosing the most palatable food source of an offered diet when exposed to a phytoplankton mixture as also reported in earlier works (Pérez-Morales et al. 2014). Measuring the GTT of planktonic crustaceans using the Phyto-PAM is a recent method (Sastri et al. 2011) and our measurements with single diets tended to be quite similar to previous studies using conventional approaches (Murtaugh 1985, Lampert 1987a). We did note that the degradation of photosynthetic pigments can interfere in fluorescence measurements using the PhytoPAM. However, a correction factor can be applied by using the green signal present in the 100% cyanobacteria treatments.

D. magna body size did not significantly influence gut transit times. This despite the fact that a body size dependence of GTT has been observed in several studies across a variety of phytoplankton and cladoceran species (Haney et al. 1985, Nogueira et al. 2004). It appears that body size (linked to animal age in cladocerans) can interact with abiotic factors like temperature and affect feeding behavior (Burns 1969, Haney et al. 1985). Meanwhile, Burns (1969) showed that smaller animals have reduced filtering rates. In our study, despite a non-significant difference in GTT between small and large animals, the trend was toward longer GTTs in larger animals (low positive slope in Fig. 3.2). Indeed, Haney (1985) measured the same propensity for filtering rate. The concentration of food provided may explain the difference of significance between studies.

The GTT of animals fed diets consisting entirely of *M. aeruginosa* were significantly faster than those fed pure *S. obliquus*. We also found that cyanobacterial toxicity can have a dramatic influence on *D. magna* feeding rates. The measurements of GTT followed no particular trend when MC-producing *Microcystis* were offered, largely because very little was ingested. While it may have been possible to increase the sensitivity of our measurements by increasing the number of animals used in each *Fo* measurement, this approach

also tended to decrease the stability of the measured fluorescence signal because of animal movement. Nizan et al. (1986) demonstrated that this feeding inhibition was due to defensive mechanisms of daphniids against MC-producing cyanobacteria, supposing then an aptitude for daphniids to recognize their food. No significant difference in GTT was measured when *Daphnia* were offered diets that were at minimum 50% composed of *Scenedesmus*. Thus, we infer that variation in *D. magna* GTT was not altered to relatively low to moderate levels of *M. aeruginosa* (MC-producing or MC-lacking). Relative to 100% *M. aeruginosa* (MC-lacking) diet treatment, we found that the GTT was significantly faster for diets containing 75% *M. aeruginosa*. In addition, that for the 75% *M. aeruginosa* treatments we found no significant difference in GTT between the MC-producing and MC-lacking strains, indicating that toxicity is likely not the only cause of decreasing GTT. Therefore, food quality shifts are likely responsible for the significant differences in GTT observed between green and MC-lacking cyanobacteria diets. Various studies have demonstrated that the quantity of food available to grazers is more important with diets of *S. obliquus* than for those with *M. aeruginosa* (Rhee and Gotham 1980, Hecky 1988), indicating that other factors may influence the variations of zooplankton feeding. In addition, it is possible that diets with a higher relative concentration of cyanobacteria are linked to faster GTTs because *Daphnia* are not able to efficiently digest these cells. For instance, Porter (1973) demonstrated that some strains of cyanobacteria possess a gelatinous surface membrane that could decrease GTT by allowing ingested particles to pass through the gut undamaged.

Moreover, previous studies (Van Donk and Hessen 1993, Lürling and van Donk 1997) have observed that feeding on phosphorus-depleted phytoplankton can lead to reduced clearance and growth rates in *D. pulex*. Phosphorus content is considered a good indicator of overall food quality (Gulati and DeMott 1997, Seidendorf 2010). Lürling and van Donk (1997) have shown that *Microcystis*

aeruginosa is a poorer source of phosphorus than *Scenedesmus* (Redfield stoichiometry C:N:P of 238:18:1 and 112:22:1 respectively), although P can interact with other chemical compounds, modulating their toxicity (Baxter et al. 2013). Relative to cyanobacteria, green algae are considered a better source of poly-unsaturated fatty acids (PUFA) (Müller-Navara 1995, Müller-Navara *et al.*, 2000), a fatty acid class that is essential for zooplankton growth (Gulati and DeMott 1997, Taipale et al. 2011). Study lead by Ahlgren *et al.* (1992) has shown that quality of fatty acids vary between phytoplanktonic species and PUFAs measured in their grazers are strongly correlated to their diet composition (Masclaux *et al.* 2012). Indeed, fatty acids of the green alga *S. acutus* are 40% PUFA, while the cyanobacteria *Synechococcus elongatus* only contained 6% PUFA (DeMott and Müller-Navara 1997). Moreover, highly unsaturated fatty acid (HUFA), a subclass of PUFA, has been even identified as a crucial key for energetic efficiency in plant-animal interface i.e. to lay the good foundations for a strong trophic chain (Brett and Müller-Navarra, 1997). Differences in PUFA and P-content complement our feeding study and demonstrate that *D. magna* selects more nutritional food when other options are available. Our feeding experiments also show that *D. magna* avoids ingesting toxic cells. This observation may be related to studies that found that MC-producing *M. aeruginosa* negatively affected *Daphnia* ingestion rates by slowing both maxillary and mandibular movement rates (Rohrlack et al. 1999; Ghadouani et al. 2004).

Our experiments have shown, in addition to previous results showing that diet composition influences growth and reproduction success (Lürling and Van Der Grinten, 2003), that diet composition is extremely important for *D. magna* feeding behavior. GTT increased in the presence of high relative concentrations of cyanobacteria cells, especially in the presence of cyanotoxins providing evidence of feeding disruption. Meanwhile, we have demonstrated that when alternative higher quality food items are available, *D. magna* concentrates its

feeding effort on these. Indeed, with the experiments conducted in this study, it appears that *D. magna* is able to select in favor of the most beneficial valuable phytoplankton species. However, this ability is reduced when cyanobacteria are present in high proportions.

It can be concluded that in our laboratory conditions, gut transit time of *Daphnia* was affected by the presence of cyanobacteria in its diet. In order to face this changing food quality, *Daphnia* was able to focus its feeding on a better food quality found in green algae. However, this ability was reduced by increasing cyanobacteria quantity in the diet. Cyanotoxicity cannot be targeted as the only reason for the observed effects, as MC-lacking strain of *M. aeruginosa* also modulated the gut transit time. Further investigations on *Daphnia* satiety would be interesting to understand if lower quality food can induce an increased digestion effort as Capparo and Carlotti (1996) did by using a copepod based model. Indeed, as soon as copepods have been demonstrated to be more selective in their diet (Pace *et al.* 1990, Zollner *et al.* 2009), it can be hypothesize that their GTT would be even more affected by different diet quality than it has been shown here for cladocerans.

3.7 References

- Ahlgren G, Gustafsson IB, Boberg M. 1992. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. *Journal of Phycology* 28:37-50.
- Alva-Martínez AF, Sarma SSS, Nandini S. 2004. Population growth of *Daphnia pulex* (Cladocera) on a mixed diet (*Microcystis aeruginosa* with *Chlorella* or *Scenedesmus*). *Crustaceana* 77(8):973-988.
- Baxter LR, Sibley PK, Solomon KR, Hanson ML. 2013. Interactions between atrazine and phosphorus in aquatic systems: Effects on phytoplankton and periphyton. *Chemosphere* 90(3):1069-1076.
- Burns CW. 1969. Relation between filtering rate, temperature, and body size in four species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 14:693-700.
- Brett MT, Müller-Navarra DC. 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes. *Freshwater Biology* 38:483-499.
- Caparroy P, Carlotti F. 1996. A model for *Acartia tonsa*: Effect of turbulence and consequences for the related physiological processes. *Journal of Plankton Research* 18(11):2139-2177.
- Chen W, Song L, Ou D, Gan N. 2005. Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR. *Environ Toxicol.* 20:323-330.

- Coelho H, Calado R, Olaguer-Feliú AO, Vieira S, Queiroga H, Serôdio J. 2009. Nondestructive quantification of phytoplankton gut content of brachyuran crab megalopae using in vivo chlorophyll a fluorescence. *Journal of Plankton Research* 31(5):577-581.
- Demott WR, Müller-Navarra DC. 1997. The importance of highly unsaturated fatty acids in zooplankton nutrition: Evidence from experiments with *Daphnia*, a cyanobacterium and lipid emulsions. *Freshwater Biology* 38(3):649-664.
- Demott WR, Qing-Xue Z, Carmichael WW. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology & Oceanography* 36(7):1346-1357.
- Ferrão-Filho AS, Azevedo SMFO, DeMott WR. 2000. Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology* 45(1):1-19.
- Ghadouani A, Pinel-Alloul B, Plath K, Codd GA, Lampert W. 2004. Effects of *Microcystis aeruginosa* and purified microcystin-LR on the feeding behavior of *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography* 49(3):666-679.
- Gulati RD, Demott WR. 1997. The role of food quality for zooplankton: Remarks on the state -of-the-art, perspectives and priorities. *Freshwater Biology* 38(3):753-768.

- Guo N, Xie P. 2006. Development of tolerance against toxic *Microcystis aeruginosa* in three cladocerans and the ecological implications. *Environmental Pollution* 143(3):513-518.
- Haney JF. 1985. Regulation of cladoceran filtering rates in nature by body size, food concentration, and diel feeding patterns. *Limnology and Oceanography* 30(2):397-411.
- Hansen B, Bjornsen PK, Hansen PJ. 1994. The size ratio between planktonic predators and their prey. *Limnology and Oceanography* 39(2):395-403.
- Hecky RE, Kilham P. 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnology & Oceanography* 33(4):796-822.
- Ivlev VS. 1961. Experimental ecology of the feeding of fishes. New Haven (CT): Yale University Press. in Lechowicz MJ. 1982. The sampling characteristics of electivity indices. *Oecologia* 52(1):22-30.
- Kilham SS, Kreeger DA, Lynn SG, Goulden CE, Herrera L. 1998. COMBO: A defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* 377(1-3):147-159.
- Lampert, W. (1987a) Feeding and nutrition in *Daphnia*. *Memorie dell'istituto Italiano di Idrobiologia* dott. Marco De Marchi, 45:143-192.

- Lampert W. 1987. Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *New Zealand Journal of Marine & Freshwater Research* 21(3):483-490.
- Liu Y, Xie P, Wu XP. 2006. Effects of toxic and nontoxic *Microcystis aeruginosa* on survival, population-increase, and feeding of two small cladocerans. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77(4):566-573.
- Lürling M. 2003. Effects of microcystin-free and microcystin-containing strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on growth of the grazer *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology* 18(3):202-210.
- Lürling M. 2003. *Daphnia* growth on microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa* in different mixtures with the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Limnology and Oceanography* 48(6):2214-2220.
- Lürling M, van der Grinten E. 2003. Life-history characteristics of *Daphnia* exposed to dissolved microcystin-LR and to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with and without microcystins. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(6):1281-1287.
- Lürling M, van Donk E. 1997. Life history consequences for *Daphnia pulex* feeding on nutrient-limited phytoplankton. *Freshwater Biology* 38(3):693-709.

- Masclaux H, Bec A, Kainz MJ, Perrière F, Desvillettes C, Bourdier G. 2012. Accumulation of polyunsaturated fatty acids by cladocerans: effects of taxonomy, temperature and food. *Freshwater Biology* 57:696-703.
- Murtaugh PA. 1985. The influence of food concentration and feeding rate on the gut residence time of *Daphnia*. *Journal of Plankton Research* 7(3):415-420.
- Müller-Navarra D. 1995. Evidence that a highly unsaturated fatty acid limits *Daphnia* growth in nature. *Archiv für Hydrobiologie* 132(3):297-307.
- Müller-Navarra D, Brett MT, Liston AM and Goldman CR. 2000. A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature*. 403:74-77.
- Nizan S, Dimentman C, Shilo M. 1986. Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. *Limnology & Oceanography* 31(3):497-502.
- Nogueira ICG, Saker ML, Pflugmacher S, Wiegand C, Vasconcelos VM. 2004. Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology* 19(5):453-459.
- Pace ML, McManus GB, Findlay SEG. 1990. Planktonic community structure determines the fate of bacterial production in a temperate lake. *Limnology and Oceanography* 35:795-808.

- Peters RH, Downing JA. 1984. Empirical analysis of zooplankton filtering and feeding rates. *Limnology & Oceanography* 29(4):763-784.
- Porter KG. 1973. Selective grazing and differential digestion of algae by zooplankton. *Nature* 244(5412):179-180.
- Rhee G-Y, Gotham IJ. 1980. Optimum N:P ratios and coexistence of planktonic algae. *Journal of Phycology* 16(4):486-489.
- Richardson K, Beardall J, Raven JA. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytologist* 93(2):157-191.
- Rohrlack T, Dittmann E, Henning M, Börner T, Kohl JG. 1999. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2):737-739.
- Rohrlack T, Henning M, Kohl JG. 1999. Mechanisms of the inhibitory effect of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia galeata*'s ingestion rate. *Journal of Plankton Research* 21(8):1489-1500.
- Rohrlack T, Dittmann E, Börner T, Christoffersen K. 2001. Effects of Cell-Bound Microcystins on Survival and Feeding of *Daphnia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8):3523-3529.
- Sarma SSS, Nandini S. 2006. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *Journal of Environmental Science and Health - Part B*

Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes 41(8):1417-1430.

Sarnelle O, Wilson AE. 2005. Local adaptation of *Daphnia pulicaria* to toxic cyanobacteria. *Limnology and Oceanography* 50:1565-1570.

Sastri AR, Beisner BE, Juneau P. 2011. In vivo determination of *Daphnia* feeding rates using PAM fluorometry. *Journal of Plankton Research* 33(9):1455-1459.

Seidendorf B, Meier N, Petrusek A, Boersma M, Streit B, Schwenk K. 2010. Sensitivity of *Daphnia* species to phosphorus-deficient diets. *Oecologia* 162(2):349-357.

Shapiro J. 1973. Blue-green algae: Why they become dominant. *Science* 179(4071):382-384.

Sundbom M, Vrede T. 1997. Effects of fatty acid and phosphorus content of food on the growth, survival and reproduction of *Daphnia*. *Freshwater Biology* 38(3):665-674.

Taipale SJ, Kainz MJ, Brett MT. 2011. Diet-switching experiments show rapid accumulation and preferential retention of highly unsaturated fatty acids in *Daphnia*. *Oikos* 120(11):1674-1682.

[USEPA] Environmental Protection Agency. 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-85/013.

van Donk E, Hessen DO. 1993. Grazing resistance in nutrient-stressed phytoplankton. *Oecologia* 93(4):508-511.

Wilson, A.E., Sarnelle O. and Tillmans A.R. 2006. Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta-analyses of laboratory experiments. *Limnology and Oceanography* 51:1915-1924

Zöllner E, Hoppe HG, Sommer U, Jurgens K. 2009. Effect of zooplankton mediated trophic cascades on marine microbial food web components (bacteria, nanoflagellates, ciliates). *Limnology and Oceanography* 54:262-275.

3.8 Tables

Table 3.1.: Gut Transit Time values of *D. magna* in min:ss \pm standard error for

<i>M. aeruginosa</i>	Proportion <i>S.o</i> / <i>M.a.</i>				
	100/0	75/25	50/50	25/75	0/100
Non-toxic	27:20 \pm 6:53	27:42 \pm 6:20	28:57 \pm 5:07	12:40 \pm 00:29	19:42 \pm 5:01
Toxic		18:58 \pm 6:42	25:13 \pm 4:13	7:03 \pm 1:41	N/A

each diet offered. CPCC 632 is the non-toxic strain of *M. aeruginosa*, CPCC299 is the toxic one. GTT for an exclusive diet of CPCC 299 was not assessable.

Table 3.2.: Ivlev's Electivity Index for each diet. A value of 0 (zero) indicates not electivity. All values are significantly different of 0 indicating an electivity for *Scenedsemus obliquus*.

<i>S.o.</i> / <i>M.a.</i>	Non-toxic	Toxic
75 / 25	0.49	0.44
50 / 50	0.61	0.41
25 / 75	0.19	0.5

3.9 Figures

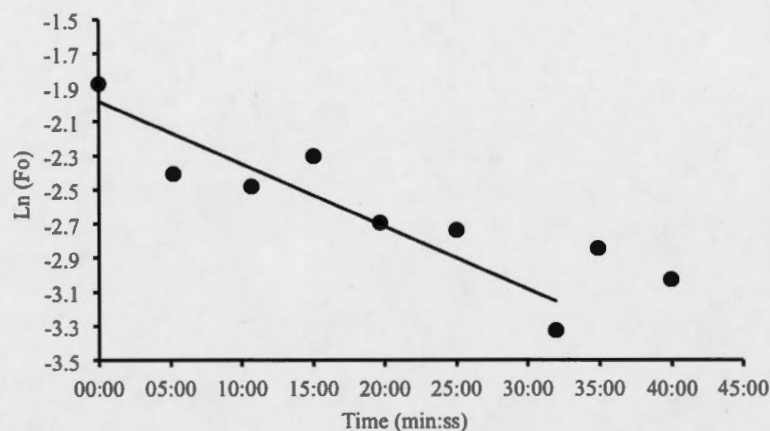


Figure 3.1.: Example of a gut transit time (minutes) determination. The natural logarithm of the intra-gut fluorescence (F_o) is plotted against time. The GTT is calculated as $-1 / a$, where a is the slope of the linear regression of time versus $\ln(F_o)$.

In this example, $a = -24:13$, and yields a GTT of ~ 27 minutes.

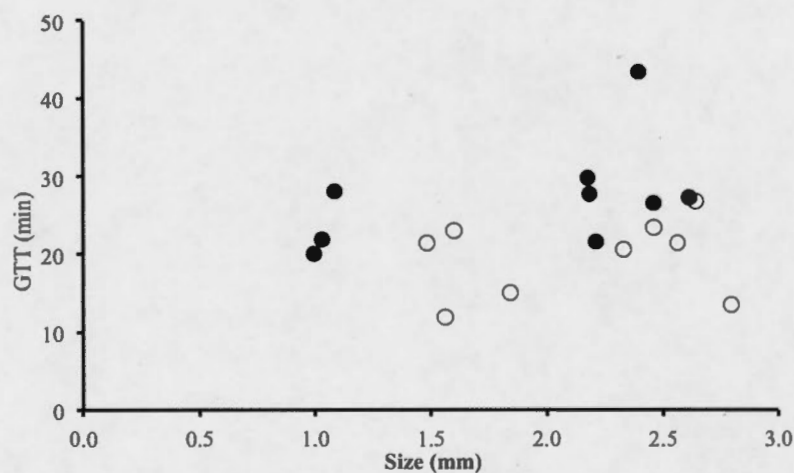


Figure 3.2.: Gut transit time (GTT; minutes) versus *D. magna* body length (mm). Animals were fed the green alga *S. obliquus* (black symbols) or the non-toxic cyanobacteria *M. aeruginosa* CPCC 632 (white symbols). There was no significant relationship between body size and GTT regardless of whether or not each diet was treated separately or when all GTT measurements were pooled.

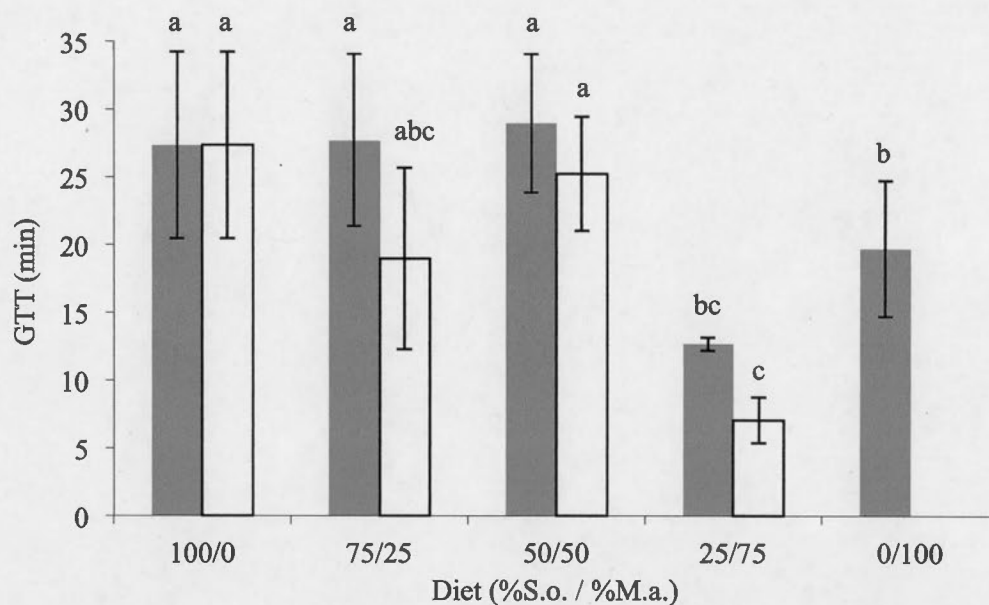


Figure 3.3.: Comparison of *D. magna* GTTs corresponding to diets containing variable proportions of *S. obliquus* (% *S. obliquus*) and *M. aeruginosa* (% *M. aeruginosa*). Each bar represents the mean GTT (plus standard error, n=3) for each diet treatment. Grey bars are diet treatments which included non-toxic *M. aeruginosa* (CPCC 632) and white bars represent diet treatments using the toxic strain (CPCC 299). Letters a, b and c indicate significant differences between treatments ($\alpha = 0.05$).

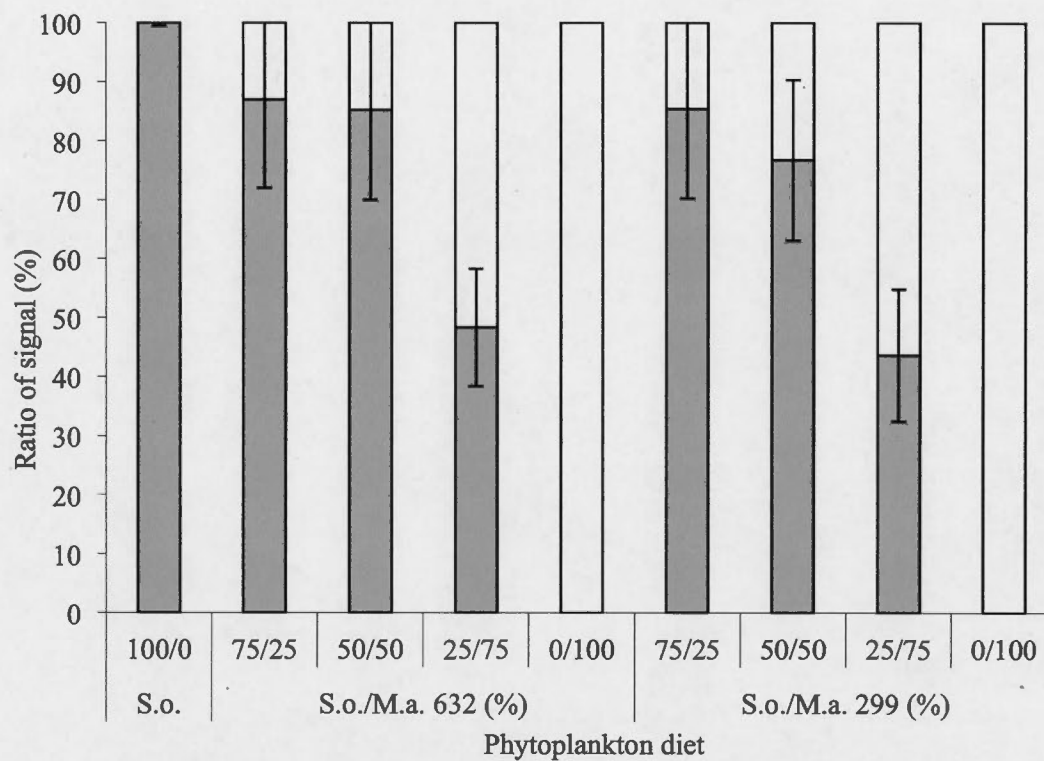


Figure 3.4.: The ratio of *S. obliquus* and *M. aeruginosa* in the intestine of *D. magna* exposed to each diet treatment following correction for the proportion of "green" signal arising from cyanobacteria degradation.

CONCLUSION

Les travaux présentés dans ce mémoire visaient à comprendre l'impact direct et indirect d'une contamination par un herbicide dont l'agent actif est le glyphosate. Les phénomènes météorologiques peuvent en effet transporter, au moins en partie, les pesticides épandues hors du champ cultivé. Le phytoplancton constitué d'organismes photosynthétiques se retrouve alors directement exposé à l'herbicide, provoquant alors des perturbations au niveau cellulaire et métabolique. De plus, le phytoplancton constitue la base de la chaîne trophique, et une modulation de sa concentration ou de sa communauté peut laisser prévoir une réaction de ses consommateurs primaires et *in fine* une répercussion sur l'ensemble de l'écosystème. Deux axes principaux se sont alors dégagés : 1. Investiguer la réponse photosynthétique de *S. obliquus* et de *M. aeruginosa* face à une contamination par le glyphosate ainsi que les mécanismes enzymatiques de réponses liés au stress oxydatifs qui en résulte et 2. Appréhender la modulation de l'effort de nutrition du cladocère *D. magna*, consommateur du phytoplancton, face à une modification de son régime alimentaire potentiellement induite par ce type de pollution.

Dans la première partie de ce projet, l'impact d'une solution commerciale de glyphosate (Factor 540®) sur l'efficacité de la photosynthèse de l'algue verte *Scenedesmus obliquus* et deux souches de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa*, une non-toxique et une toxique. Étant attendu une moins bonne assimilation de l'énergie par la chaîne photosynthétique de ces organismes, la mesure d'enzymes antioxydantes a été mesurée en réponse à un stress oxydatif potentiellement induit par une telle contamination à l'herbicide. En mesurant la fluorescence chlorophyllienne, nous avons constaté qu'il y a un impact au niveau des centres réactionnels du PSII, conformément à ce qui était attendu. En effet, le glyphosate interfère dans l'activité de l'enzyme EPSPS, limitant la production

d'acides aminés constitutifs du CR. Cet effet est particulièrement observé après 24h mais semble atténué après 72 et 96h. Si aucune perte d'énergie sous forme de chaleur n'est constatée, une augmentation de l'activité des enzymes telles que la catalase, l'ascorbate peroxydase ou encore la superoxyde dismutase a été observée pour les contaminations les plus importantes (1 et 2 mg.L⁻¹). Là encore, cette réponse est observée à court terme (24h) mais n'est pas retrouvée après 96h, suggérant soit une nocivité de l'herbicide sur les enzymes diminuant ainsi leur activité, soit dans une moindre mesure la dégradation du glyphosate à moyen terme. Conjointement, un suivi de croissance des cellules phytoplanctoniques a montré également une diminution du taux de croissance pour les échantillons exposés aux plus fortes concentrations en glyphosate.

La seconde partie des travaux visait alors à évaluer la réaction des prédateurs du phytoplancton. Le principe de l'expérimentation consistait à proposer des mélanges d'algues vertes et de cyanobactéries en différentes proportions à des daphnies. Les travaux de cette maîtrise reposaient sur l'utilisation novatrice d'un fluorimètre, le phyto-PAM, dans la mesure directe du contenu intestinal des daphnies. Une mesure de ce contenu à intervalles réguliers de 5 min a permis de déterminer la modulation du temps de transit intestinal en fonction des diètes offertes. Les résultats montrent que le temps de transit intestinal des daphnies est réduit lorsque la diète est composée majoritairement de cyanobactéries. Cet effet est d'autant plus marqué que les cyanobactéries sont toxiques. Ce temps de transit intestinal n'a d'ailleurs pas pu être déterminée lors de la présence d'une diète composée exclusivement de cyanobactéries toxiques. L'encapsulation des cyanobactéries dans des membranes lubrifiées constitue une des hypothèses pouvant expliquer ce phénomène : la digestion est alors plus difficile et le passage au travers du tractus intestinal est probablement facilité. Le contenu des intestins a alors été étudié afin d'investiguer la capacité d'électivité des daphnies

envers sa nourriture. Le phyto-PAM a permis de déterminer la proportion d'algues vertes et de cyanobactéries qui a ensuite été comparée à la proportion dans la diète proposée aux daphnies. Le constat est que les daphnies ont été capables de discriminer leur nourriture en faveur de *S. obliquus* qui constitue une nourriture plus favorable pour des diètes composées principalement de l'algue verte. Toutefois, cette aptitude est atténuée voire annihilée en présence d'une diète composée majoritairement de cyanobactérie.

Même si ce projet de recherche permet de conclure en partie quant à la nocivité directe et indirecte d'une solution commerciale de glyphosate, des expérimentations *in situ* permettraient d'en appuyer les conclusions. En effet, il a notamment été répertorié des produits de décomposition du glyphosate dans l'environnement qui s'avère être bien plus délétère que le glyphosate lui-même (Gomes *et al.*, 2014b). L'action combinée d'un ou plusieurs de ces produits de décompositions avec d'autres composés, issus de l'activité anthropique ou non, laisse présager de nombreux effets sur les communautés phytoplanctoniques.

C'est également le cas pour le comportement du zooplancton. Certes, une contamination de l'écosystème peut tout-à-fait engendrer des modifications des communautés phytoplanctoniques, sources de nourritures pour le zooplancton, mais la complexité de l'écosystème tout entier peut laisser envisager une source de nutrition alternative. Toutefois, nos travaux montrent qu'une modification importante du régime alimentaire peut affecter la nutrition des consommateurs primaires. Finalement, des perturbations à ce qui constitue donc la base de la chaîne trophique permettent d'émettre des préoccupations sur l'ensemble de celle-ci, d'autant que les changements climatiques laissent à prévoir une multiplication des efflorescences de cyanobactéries (Paul, 2008).

D'un point de vue plus pratique, il serait intéressant par la suite de mettre au point la technique de suivi du contenu intestinal par fluorescence pour d'autres

animaux. En effet, des essais préliminaires ont montré par exemple que des organismes tels que les copépodes sont trop opaques pour mesurer directement le contenu gastrique ou encore que les rotifères sont trop petits pour permettre la détection d'un signal de fluorescence dans leur tractus intestinal.

Enfin, le glyphosate étant avant tout une molécule chimique de synthèse, il serait particulièrement intéressant de mesurer son effet direct sur le zooplancton.

RÉFÉRENCES

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, p. 121-126
- Ahsan, N., Lee, D. G., Lee, K. W., Alam, I., Lee, S. H., Bahk, J. D. et Lee B. H. (2008). Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(12), p. 1062-1070.
- Alva-Martínez, A. F., Sarma, S. S. S. et Nandini, S. (2004). Population growth of *Daphnia pulex* (Cladocera) on a mixed diet (*Microcystis aeruginosa* with *Chlorella* or *Scenedesmus*). *Crustaceana*, 77(8), p. 973-988.
- Annett, R., Habibi, H. R. et Hontela A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5), p. 458-479.
- Barber, J., et Kühlbrandt, W. (1999). Photosystem II. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(4), p. 469-475.
- Bassi, R., Sandonà, D. et Croce, R. (1997). Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. *Physiologia Plantarum*, 100(4), p. 769-779.
- Bending, G. D., Lincoln, S. D. et Edmondson, R. N. (2006). Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution*, 139(2), p. 279-287.
- Beyer Jr, W. F. et Fridovich, I. (1987). Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 26(5) p. 1251-1257.
- Biziuk, M., Przyjazny A., Czerwinski, J. et Wierowski M. (1996). Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. *Journal of Chromatography A*, 754(1-2), p. 103-123.
- Blake, L. (2002). *McGraw-Hill Ryerson biology 12*. Récupéré le 10 Mai 2015 de <http://sbi4u3.weebly.com/photosynthesis.html>
- Blankenship, R. E. (2002). *Molecular mechanisms of Photosynthesis*: Oxford : Blackwell Science Ltd.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), p. 248-254.
- Butler, W. L., et Kitajima, M. (1975). Energy transfer between photosystem II and photosystem I in chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 396(1), p. 72-85.
- Carpentier, R. (2004). Laboratoire de biochimie du chloroplaste et photosynthèse. Récupéré le 9 Mai 2015 de http://www.uqtr.ca/labcarpentier/fr/accueil_frames.htm
- Choi, C. J., Berges, J. A. et Young, E. B. (2012). Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: Variable responses among freshwater microalgae. *Water Research*, 46(8), p. 2615-2626.
- Couture, G., Legris, J. et Langevin, R. (1995). Évaluation des impacts du glyphosate utilisé en milieu forestier. Ministère des Ressources naturelles Québec
- De Las Rivas, Balsera, J.M. et Barber, J. (2004). Evolution of oxygenic photosynthesis: Genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins. *Trends in Plant Science*, 9(1), p. 18-25.
- Dekker, J. P. et Boekema, E. J. (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1706(1-2), p. 12-39.
- Dekker, J. P. et Van Grondelle, R. (2000). Primary charge separation in Photosystem II. *Photosynthesis Research*, 63(3), p. 195-208.
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I. et Ross, P. E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), p. 84-98.
- Demmig-Adams, B., et Adams III, W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1(1), p. 21-26.
- Demott, W. R., Zhang Qing-Xue et Carmichael, W. W. (1991). Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a

- copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology & Oceanography*, 36(7), p. 1346-1357.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G. et Popovic, R. (2005). Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic Toxicology*, 74(2), p. 150-159.
- Dewick, P. M. (1998). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 15(1), p. 17-58.
- Di Mascio, P., Devasagayam, T. P. A., Kaiser, S. et Sies, H. (1990). Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochemical Society Transactions*, 18(6), p. 1054-1056.
- Duke, S. O., et Powles, S. B. (2008). Glyphosate-resistant weeds and crops. *Pest Management Science*, 64(4), p. 317-318.
- Erb, W. (2007). *La chlorophylle*. Récupéré le 9 Mai 2015 de http://wiki.scienceamusante.net/index.php?title=La_chlorophylle
- Evens, M. (2009). *Beta Carotene - Structure*. School of Chemistry, University of Bristol. Récupéré le 9 Mai 2015 de http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene_structure.html
- Ferrão-Filho, A. S., Azevedo, S. M. F. O. et DeMott, W. R. (2000). Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology*, 45(1), p. 1-19.
- Fiedler, E., Soll, J. et Schultz, G. (1982). The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. *Planta*, 155(6), p. 511-515.
- Force, L., Critchley, C. et Van Rensen, J. J. S. (2003). New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test. *Photosynthesis Research*, 78(1), p. 17-33.
- Franz, J. E., Mao, M. K. et Sikorski, J. A. (1997). *Glyphosate : a unique global herbicide*: Oxford University Press, 653 p.

- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: A radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 201(8), p. 1203-1209.
- Fuchs, M. A., Geiger, D. R., Reynolds, T. L. et Bourque, J. E. (2002). Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti medikus*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74(1), p. 27-39.
- Funari, E. et Testai, E. (2005). Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Review in Toxicology*, 38(2), p 97-125.
- Geiger, D. R., Kapitan, S. W. et Tucci M. A. (1986). Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. *Plant Physiology*, vol. 82, p. 468-472.
- Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J. M. et Baker, N. R. (1990). The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem 2 photochemistry in leaves. *Photosynthesis Research*, 25(3), p. 249-257.
- Geoffroy, L., Frankart, C. et Eullaffroy, P. (2004). Comparison of different physiological parameters responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environmental Pollution*, 131(2), p. 233-241.
- Gevao, B., Semple, K. T. et Jones, K. C. (2000). Bound pesticide residues in soils: A review. *Environmental Pollution*, 108(1), p. 3-14.
- Gomes, M. P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M. et Juneau, P. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), p. 4691-4703.
- Gorbunov, M. Y., Kuzminov, F. I., Fadeev, V. V., Kim, J. D. et Falkowski, P. G. (2011). A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(12), p. 1591-1599.
- Gorse, I., et Balg, C. (2012). Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2010. *Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs*, p. 85.
- Govindjee, et Coleman, W. T. (1990). How plants make oxygen. 262.

- Govindjee, et Govindjee, R. (1974). The absorption of light in photosynthesis». *Scientific American*, 231, p. 50-58.
- Gulati, R. D., et Demott, W. R. (1997). The role of food quality for zooplankton: Remarks on the state -of-the-art, perspectives and priorities. *Freshwater Biology*, 38(3), p. 753-768.
- Hernando, F., Royuela, M., Muñoz-Rueda, A. et Gonzalez-Murua, C. (1989). Effect of Glyphosate on the Greening Process and Photosynthetic Metabolism in *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Plant Physiology*, 134(1), p. 26-31.
- Horton, P., Ruban, A. V. et Walters, R. G. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), p. 655-684.
- Hutber, G. N., Rogers, L. J. et Smith A. J. (1979). Influence of pesticides on the growth of cyanobacteria. *Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie*, 19(6), p. 397-402.
- Hugon, P. (2014). Y a-t-il décollage économique de l'Afrique ?. *Interventions économiques*. p. 13-16.
- Issa, A. A. (1999). Interference of glyphosate with the shikimate pathway by Cyanobacteria in chemostat culture. *Microbios*, 100(395), p. 47-55.
- Jain, M., et Bhalla-Sarin N. (2001). Glyphosate-induced increase in glutathione S-transferase activity and glutathione content in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 69(3), p. 143-152.
- Jamers, A.N. et De Coen, W.I.M. (2010). Effect assessment of the herbicide paraquat on a green alga using differential gene expression and biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(4), p. 893-901.
- Järvenpää, M. et Lindström, K. (2004). Water turbidity by algal blooms causes mating system breakdown in a shallow-water fish, the sand goby *Pomatoschistus minutus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1555), p. 2361-2365.

- Juneau, P., Qiu, B. et Deblois C.P. (2007). Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 89(4), p. 609-625.
- Kato, Y., Kobayashi, K., Watanabe, H. et Iguchi, T. (2011). Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: Deep conservation of a Doublesex gene in the sex-determining pathway. *PLoS Genetics*, 7(3).
- Kautsky, H., et Hirsch, A. (1931). Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Die Naturwissenschaften*, 19(48), p. 964.
- Kilham, S. S., Kreeger, D. A., Lynn, S. G., Goulden, C. E. et Herrera, L. (1998). COMBO: A defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia*, 377(1-3), p. 147-159.
- Kirilovsky D. et Kerfeld C.A. (2006). The Orange Carotenoid Protein: a blue-green light photoactive protein. *Photochemical and Photobiochemical Sciences*, 12(7), p.1135-1143.
- Koller, V. J., Fürhacker, M., Nersesyan, A., Mišík, M., Eisenbauer, M. et Knasmueller, S. (2012). Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Archives of Toxicology*, 86(5), p. 805-813.
- Lazár, D. (1999). Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1412(1), p. 1-28.
- Larousse. (1971). Photosynthèse. *Grande Encyclopédie Larousse*, p. 10637. Récupéré le 10 Mai 2015 de <http://www.larousse.fr/archives/grande-encyclopedia/page/10637>
- Leboulanger, C., Bouvy, M., Pagano, M., Dufour, R. A., Got, P. et Cecchi, P. (2009). Responses of planktonic microorganisms from tropical reservoirs to paraquat and deltamethrin exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(1), p. 39-51.
- Ledford, H. K. et Niyogi, K. K. (2005). Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell and Environment*, 28(8), p. 1037-1045.

- Legris, J., et Couture, G. (1989). Résidus de glyphosate dans l'eau et les sédiments suite à des pulvérisations terrestres en milieu forestier en 1985 et 1986. ministère de l'Énergie et des Ressources Gouvernement du Québec, Direction de la conservation, Service des études environnementales: 22 p
- Lürling, M. (2003a). Daphnia growth on microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa* in different mixtures with the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Limnology and Oceanography*, 48(6), p. 2214-2220.
- (2003b). Effects of microcystin-free and microcystin-containing strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on growth of the grazer *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology*, 18(3), p. 202-210.
- Lürling, M. et Van der Grinten, E. (2003). Life-history characteristics of *Daphnia* exposed to dissolved microcystin-LR and to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with and without microcystins. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(6), p. 1281-1287.
- Mallick, N. et Mohn, F. H. (2000). Reactive oxygen species: Response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*, 157(2), p. 183-193.
- Morosinotto, T., Caffarri, S., Dall'Osto, L. et Bassi, R. 2003. Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiologia Plantarum*, 119(3), p. 347-354.
- Müller, P., Li, X. P. et Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4), p. 1558-1566.
- Nakano, Y. et Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), p. 867-880.
- Olesen, C. F. et Cedergreen N. (2010). Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Pest Management Science*, 66(5), p. 536-542.
- Papageorgiou, G. C., Tsimilli-Michael, M. et Stamatakis, K. (2007). The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: A viewpoint. *Photosynthesis Research*, 94(2-3), p. 275-290.

- Paul, V.J. (2008). Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. In: K.H. Hudnell [eds.], *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 619.
- Pérez, G. L., Torremorell, A., Mugni, H., Rodríguez, P., Solange Vera, M., Do Nascimento, M., Allende, L., Bustingorry, J., Escaray, R., Ferraro M., Izaguirre, I., Pizarro, H., Bonetto, C., Morris, D. P. et Zagarese, H. (2007). Effects of the herbicide roundup on freshwater microbial communities: A mesocosm study. *Ecological Applications*, 17(8), p. 2310-2322.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitao, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D. et Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 39(6), p. 1008-1018.
- Pospisil, P., Arato, A., Krieger-Liszkay, A. et Rutherford, A. W. (2004). Hydroxyl radical generation by photosystem II. *Biochemistry*, 43(21), p. 6783-6792.
- Qian, H., Chen, W., Sun, L., Jin, Y., Liu, W. et Fu, Z. (2009). Inhibitory effects of paraquat on photosynthesis and the response to oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology*, 18(5), 537-543.
- Ralph, P. J. (2000). Herbicide toxicity of *Halophila ovalis* assessed by chlorophyll a fluorescence. *Aquatic Botany*, 66(2), p. 141-152.
- Rao, M. V., Paliyath, G. et Ormrod D. P. (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 110(1), p. 125-136.
- Rawn, J.D. (1989). *Traité de Biochimie, traduit de l'anglais par Camille François*, Editions de Boeck Université, Editions du Renouveau Pédagogique inc., 1146 p.
- Raven, P.H., Evert R.F. et Eichhorn S.E. (2007). *Biologie Végétale*. Éditions de Boeck Université, 880 p.
- Relyea, R. A. (2005). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities». *Ecological Applications*, 15(2), p. 618-627.

- Richardson, K., Beardall, J. et Raven, J. A. (1983). Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytologist*, 93(2), p. 157-191.
- Ricklefs, R.E., et Miller G.L. (2003). *Écologie*. Éditions de Boeck. 4^{ème} édition. 822 p.
- Rohàček, K. (2002). Chlorophyll fluorescence parameters: The definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, 40(1), p. 13-29.
- Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Börner, T. et Kohl, J. G. (1999). Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), p. 737-739.
- Rohrlack, T., Henning, M. et Kohl, J. G. (1999). Mechanisms of the inhibitory effect of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia galeata*'s ingestion rate. *Journal of Plankton Research*, 21(8), p. 1489-1500.
- Romero, D. M., Ríos de Molina, M. C. et Juárez, Á. B. (2011). Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), p. 741-747.
- Rosso, D., Bode, R., Li, W., Krol, M., Saccon, D., Wang, S., Schillaci, L. A., Rodermel, S. R., Maxwell, D. P. et Hüner, N. P. A. (2009). Photosynthetic redox imbalance governs leaf sectoring in the *arabidopsis thaliana* variegation mutants *immutans*, *spotty*, *var1*, and *var2*. *Plant Cell*, 21(11), p. 3473-3492.
- Ruban, A. V., Johnson, M. P. et Duffy, C. D. P. (2012). The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(1), p. 167-181.
- Rutherford, William, A., et Krieger-Liszkay, A. (2001). Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(11), p. 648-653.
- Santé Canada. (1987). Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada - Documentation à l'appui - Le glyphosate. Récupéré le 10 Mai

2015 de <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/glyphosate/index-fra.php>

- Saxton, M. A., Morrow, E. A., Bourbonniere, R. A. et Wilhelm, S. W. (2011). Glyphosate influence on phytoplankton community structure in Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research*, 37(4), p. 683-690.
- Schreiber, U., Schliwa, U. et Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10(1-2), p. 51-62.
- Shapiro, J. (1973). Blue-green algae: Why they become dominant. *Science*, 179(4071), p. 382-384.
- Shimoni, E., Rav-Hon, O., Ohad, I., Brumfeld, V. et Reich, Z. (2005). Three-dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. *Plant Cell*, 17(9), p. 2580-2586.
- Strasser, R. J., Srivastava, A. et Govindjee. (1995). Polyphasic chlorophyll alpha fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 61(1), p. 32-42.
- Strasser, R. J., Srivastava, A. et Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as tool to characterize and screen photosynthetic samples. In *Probing photosynthesis : mechanisms, regulation and adaptation.*, Yunus, M., Pathre, U. et Mohanty, P., p. 445-483. London: Taylor and Francis.
- , (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In *Chlorophyll fluorescence a signature of photosynthesis, advances in photosynthesis and respiration*, G. Papageorgiou et Govindjee, p. 321-362. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Strasser, R. J., et A. Stirbet, D. (2001). Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O-J-I-P - Fitting of experimental data to three different PS II models. *Mathematics and Computers in Simulation*, 56(4-5), p. 451-461.
- Szigeti, Z., et Lehocski E. (2003). A review of physiological and biochemical aspects of resistance to atrazine and paraquat in Hungarian weeds. *Pest Management Science*, 59(4), p. 451-458.

- Taiz, L., et Zeiger, E.. (2010). *Plant Physiology*, 5th: Sinauer Associates, Inc.
- Tillmanns, A. R., Wilson, A. E., Pick, F. R. et Sarnelle, O. (2008). Meta-analysis of cyanobacterial effects on zooplankton population growth rate: Species-specific responses. *Fundamental and Applied Limnology*, 171(4), p. 285-295.
- Triantaphylidès, C., et Havaux, M.. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 14(4), p. 219-228.
- Uotila, M., Gullner, G. et Komives, T. (1995). Induction of glutathione S-transferase activity and glutathione level in plants exposed to glyphosate. *Physiologia Plantarum*, 93(4), p. 689-694.
- Vendrell, E., Gómez De Barreda Ferraz, D., Sabater, C. et Carrasco, J. M. (2009). Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: A microplate bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(5), p. 538-542.
- Vredenberg, W. J. (2000). A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination. *Biophysical Journal*, 79(1), p. 26-38.
- Wolfe-Simon, F., Grzebyk, D., Schofield, O. et Falkowski, P. G. (2005). The role and evolution of superoxide dismutases in algae. *Journal of Phycology*, 41(3), p. 453-465.
- Wong, P. K. (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*, 41(1-2), p. 177-182.
- Ziková, A., et Kopp, R. (2008). Impacts of microcystin, a cyanobacterial toxin, on laboratory rodents in vivo. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 56(5), p. 263-273.